

SÉRIE A, n° 1847

N° D'ORDRE

2714

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

MAX LAFON

ANCIEN ÉLÈVE DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE,
AGRÉGÉ DE L'UNIVERSITÉ,
CHARGÉ DE RECHERCHES.

1^{re} Thèse : **Recherches sur quelques aspects du besoin
qualitatif d'azote.**

2^{me} Thèse : **Propositions données par la Faculté.**

-7 FÉV. 1939

Soutenues le

1939, devant la Commission d'examen

Président : MM. Ch. PÉREZ,

Examineurs : { R. LÉVY,
E. AUBEL.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1939

SÉRIE A, N° 1847

N° D'ORDRE

2714

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

MAX LAFON

ANCIEN ÉLÈVE DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE,

AGRÉGÉ DE L'UNIVERSITÉ,

CHARGÉ DE RECHERCHES.

**1^{re} Thèse : Recherches sur quelques aspects du besoin
qualitatif d'azote.**

2^{me} Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

1939, devant la Commission d'examen

Président : MM. Ch. PÉREZ,

Examineurs : { R. LÉVY,
E. AUBEL.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

—
1939

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire..... M. MOLLIARD.

Doyen..... C. MAURAIN, Professeur, Physique du Globe.

Professeurs honoraires.



(H. LEBESGUE.
A. FERNBACH.
EMILE PICARD.
LÉON BRILLOUIN.
GUILLET.
PÉCHARD.
FREUNDLER.
AUGER.

BLAISE.
DANGEARD.
LESPIEAU.
MARCHIS.
VESSIOT.
PORTIER.
MOLLIARD.
LAPICQUE.

G. BERTRAND.
ABRAHAM.
Ch. FABRY.
LÉON BERTRAND.
WINTREBERT.
DUBOSCO.
BOHN.
RABAUD.

PROFESSEURS

M. CAULLERY..... T Zoologie (Evolution des êtres organisés).
N..... Chimie générale.
Emile BOREL..... T Calcul des probabilités et Physique mathém.
Jean PERRIN..... T Chimie physique.
E. CARTAN..... T Géométrie supérieure.
A. COTTON..... T Recherches physiques.
J. DRACH..... T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
Charles PÉREZ..... T Zoologie.
M. GUICHARD..... T Analyse et mesures chimiques.
Paul MONTEL..... T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.
L. BLARINGHEM..... T Botanique.
G. JULIA..... T Mécanique analytique et Mécanique céleste.
C. MAUGUIN..... T Minéralogie.
A. MICHEL-LÉVY..... T Pétrographie.
H. BÉNARD..... T Mécanique expérimentale des fluides.
A. DENJOY..... T Application de l'analyse à la Géométrie.
L. LUTAUD..... T Géographie physique et géologie dynamique.
Eugène BLOCH..... T Physique.
G BRUHAT..... T Physique théorique et physique céleste.
E. DARMOIS..... T Enseignement de Physique.
A. DEBIERNE..... T Physique Générale et Radioactivité.
A. DUFOUR..... T Physique (P.C.B.).
L. DUNOYER..... T Optique appliquée.
A. GUILLIERMOND..... T Botanique.
M. JAVILLIER..... T Chimie biologique.
ROBERT LÉVY..... T Physiologie comparée.
F. PICARD..... Zoologie (Evolution des êtres organisés).
Henri VILLAT..... T Mécanique des fluides et applications.
Ch JACOB..... T Géologie.
P. PASCAL..... T Chimie minérale.
M. FRÉCHET..... T Calcul différentiel et Calcul intégral.
E. ESCLANGON..... T Astronomie.
M^{me} RAMART-LUCAS..... T Chimie organique.
H. BÉGHIN..... T Mécanique physique et expérimentale.

FÖCH..... Mécanique expérimentale des fluides.
PAUTHENIER..... Physique (P.C.B.).
DE BROGLIE..... T Théories physiques.
CHRÉTIEN..... Optique appliquée.
P. JOB..... Chimie générale.
LABROUSTE..... Physique du Globe.
PRENANT..... T Anatomie et Histologie comparées.
VILLEY..... Mécanique physique et expérimentale.
COMBES..... T Physiologie végétale.
GARNIER..... T Mathématiques générales.
PÉRÈS..... Mécanique théorique des fluides.
HACKSPILL..... Chimie (P.C.B.).
LAUGIER..... T Physiologie générale.
TOUSSAINT..... Technique Aéronautique.
M. CURIE..... Physique (P.C.B.).
G. RIBAUD..... T Hautes températures.
CHAZY..... T Mécanique rationnelle.
GAULT..... Chimie (P.C.B.).
CROZE..... Recherches physiques.
DUPONT..... T Théories chimiques.
LANQUINE..... T Géologie structurale et géologie appliquée.
VALIRON..... Mathématiques générales.
BARRABÉ..... Géologie structurale et géologie appliquée.
MILLOT..... Biologie animale (P. C. B.).
F PERRIN..... Théories physiques.
VAVON..... Chimie organique.
G. DARMOIS..... Calcul des probabilités et Physique mathém.
CHATTON..... T Biologie maritime.
AUBEL..... Chimie biologique.
Jacques BOURCART..... Géographie physique et Géologie dynamique.
M^{me} JOLIO-CURIE.. Physique générale et Radioactivité.
PLANTEFOL..... Biologie végét. (P.C.B.).
CABANNES..... Enseignement de Physique.
GRASSÉ..... Biologie anim. (P.C.B.).
PRÉVOST..... Chimie (P.C.B.).
BOULIGAND..... Mathématiques.

Secrétaire.....

A. PACAUD.

Secrétaire honoraire.....

D. TOMBECK

Recherches sur quelques aspects du besoin qualitatif d'azote,

- A) Rôle physiologique des acides aminés indispensables à la croissance chez les Vertébrés.
- B) Besoin qualitatif d'azote chez un Invertébré.

SOMMAIRE.

Introduction	7
--------------------	---

PREMIÈRE PARTIE.

Esquisse d'une analyse biométrique et physiologique des carences en lysine et en cystine (Etude sur le Rat et la Souris).....	11
INTRODUCTION ET HISTORIQUE	11
CHAPITRE I. — Méthodes et Techniques	16
1) Composition et préparation des régimes artificiels.	17
2) Techniques de mesure	23
CHAPITRE II. — Etude biométrique et physiologique des carences en lysine et en cystine	26
1) Etude biométrique	27
a) De la carence en lysine	27
α) Chez le Rat	27
β) Chez la Souris	31
b) De la carence en cystine	35
2) Etude physiologique de quelques processus liés à l'âge	42
a) L'involution du thymus	42
b) L'ossification	45
c) Les fonctions de reproduction	50

CHAPITRE III. — Modifications expérimentales produites par l'action de diverses hormones chez les animaux carencés en lysine et en cystine	58
1) L'hormone somatotrope de l'hypophyse antérieure.....	59
2) La thyroxine	69
3) Les prolans	74
CHAPITRE IV. — Effets des carences sur les premières phases de la croissance	77
1) La croissance intra-utérine	77
2) La croissance du nourrisson	84
3) Croissance et morphogénèse	94
CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE.....	97

DEUXIÈME PARTIE.

Essai sur le besoin qualitatif d'azote chez un insecte : <i>Drosophila melanogaster</i> Meig	105
INTRODUCTION ET HISTORIQUE	105
CHAPITRE I. — Matériel et Techniques	111
1) Matériel	111
2) Conditions expérimentales	112
a) Physiques	112
b) Biologiques	112
3) Marche générale des expériences	115
a) Composition des milieux	117
b) Confection des milieux	118
c) Ensemencement	119
CHAPITRE II. — L'indéterminé alimentaire non-protéique..	120
1) La Drosophile et les vitamines nécessaires aux Vertébrés	120
2) Principes hydrosolubles inconnus nécessaires à la Drosophile. Leurs propriétés physiques et chimiques	127
CHAPITRE III. — L'alimentation azotée.....	130
1) Valeur alimentaire des produits de la dégradation complète des protides	130

2) Existence de protides complets et de protides incomplets. Supplémentation	132
3) Les acides aminés indispensables	134
a) Le tryptophane	134
b) La cystine.....	136
c) La lysine	137
d) L'arginine et l'histidine	138
4) Inefficacité des mélanges artificiels d'acides aminés.	140
5) La Drosophile a-t-elle besoin de composés extra- tifs ?	142
6) Existence probable d'un indéterminé alimentaire de nature protéique	144
CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE	147
Conclusions générales	154



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION.

D'abord limitées à l'étude de la valeur énergétique des rations, les recherches sur l'alimentation se sont ensuite étendues à l'étude qualitative des principes alimentaires. Dès les anciennes recherches de RUBNER sur l'inégale valeur alimentaire des divers protides, ce point de vue qualitatif était appliqué à l'étude de la nutrition azotée, dont il a complètement modifié le caractère : le « besoin d'azote » des anciens physiologistes s'est peu à peu résolu, pour une large part, en une série de besoins distincts, concernant les divers acides aminés indispensables. L'étude de quelques aspects de ce « besoin qualitatif d'azote » fait l'objet du présent travail.

Nos connaissances sur les acides aminés indispensables présentent deux lacunes principales. D'une part, la plupart des expériences ont trait à la croissance globale, ou simplement à la survie des animaux étudiés. Si elles nous permettent d'affirmer, sans l'expliquer, la nécessité de divers acides aminés, elles ne nous renseignent guère sur le rôle individuel de ces corps dans l'organisme. — D'autre part, ces expériences, effectuées sur quelques espèces « de laboratoire », n'ont qu'une portée restreinte et leurs conclusions ne sauraient être étendues sans imprudence à l'ensemble du règne animal.

Deux directions de travail s'offrent donc au chercheur : l'une consiste à préciser, par une analyse physiologique des diverses carences, le rôle de chaque acide aminé indispensable, l'autre, à étendre à divers groupes zoologiques les recherches déjà effectuées sur les Vertébrés supérieurs, pour juger de la portée des résultats acquis : l'ensemble de ces tâches déborderait évidemment le cadre d'un travail individuel ; j'ai seulement voulu marquer, par deux études précises et limitées, les deux directions qui viennent d'être indiquées.

Dans la première partie, la plus étendue, j'ai esquissé une analyse biométrique et physiologique des carences en lysine et en cystine, chez le Rat et la Souris. Parmi les acides ami-

nés indispensables, la lysine et la cystine occupent une place à part : leur présence dans la ration alimentaire n'est pas indispensable à l'entretien ; l'arrêt de la croissance est le seul effet, d'ailleurs immédiat, de leur suppression. Une première question se pose : le maintien en équilibre pondéral des jeunes animaux carencés peut-il être assimilé à un véritable entretien, comparable à celui de l'adulte ? L'analyse des carences m'a permis d'établir 1°) que ces animaux ne sont pas en entretien véritable, leur organisme étant le siège de croissances et de régressions partielles, affectant différents organes, et dont la résultante est un équilibre global apparent 2°) que divers processus physiologiques dont l'accomplissement est normalement lié à l'âge (involution thymique, ossification, puberté et périodicité du fonctionnement génital), ne sont en rien affectés par les carences en lysine et en cystine. Je me suis alors posé une deuxième question : en quoi consiste la nécessité de ces acides aminés ? la lysine et la cystine sont-elles indispensables en tant que matériaux de la synthèse protéique ? interviennent-elles seulement en assurant le fonctionnement des mécanismes humoraux qui président à la croissance ? ou bien encore jouent-elles un double rôle, à la fois « constructeur » et « fonctionnel », selon l'expression de TERROINE ? J'ai étudié sur les animaux carencés l'action expérimentale des hormones (hormone somatotrope de l'hypophyse antérieure et hormone thyroïdienne) qui interviennent dans la croissance de l'animal normal : j'ai pu m'assurer 1°) — que la lysine et la cystine jouent certainement un rôle « constructeur », car leur absence de la ration empêche tout accroissement du poids global sous l'influence des hormones de croissance 2°) — que les tissus des animaux carencés conservent cependant intacte leur capacité de réaction aux diverses hormones, dans la mesure où l'action de ces hormones ne concerne pas l'accroissement de la masse globale 3°) — que les carences en lysine et en cystine ne paraissent guère avoir de relations avec la régulation humorale de la croissance. L'analyse sommaire à laquelle je me suis limité ne me permet pas des conclusions rigoureuses ; des faits rassemblés, on peut cependant conclure avec vraisemblance que le rôle de la lysine et de la cystine est essentiellement « constructeur » : lorsque ces composés manquent dans la ration, ils peuvent sans doute être mobilisés d'un point de l'organ-

me à l'autre ; en tout cas, les mécanismes physiologiques essentiels demeurent assurés.

L'étude des premières phases de la croissance (de la conception au sevrage) vient renforcer cette conclusion.

La deuxième partie est un essai, plus restreint, sur le besoin qualitatif d'azote chez un Insecte, la *Drosophile*, que son éloignement zoologique des Vertébrés et diverses considérations pratiques m'ont amené à prendre comme objet d'étude. La petite taille et la courte durée de vie de cet insecte, qui en font un matériel précieux pour une étude statistique, rendent malaisé tout essai d'analyse physiologique. Aussi me suis-je contenté d'envisager la *Drosophile* comme un réactif global du caractère nécessaire ou contingent des divers acides aminés. Le besoin qualitatif d'azote nous apparaîtra chez cet Insecte au moins aussi complexe que chez les Mammifères, et le pouvoir de synthèse azotée encore plus réduit. Il faudra encore bien des monographies de ce genre avant que des conclusions générales puissent être formulées relativement au besoin qualitatif d'azote. Tout au moins serons nous amenés à penser, d'après les résultats de cette étude, que la complexité des besoins azotés dépend moins de la position d'un animal dans l'échelle zoologique que de la composition plus ou moins complexe de son régime alimentaire naturel.

Ce travail a été entièrement exécuté au Laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure, dont les importantes ressources matérielles ont toujours été mises très libéralement à ma disposition par Monsieur le Professeur Robert LEVY : je voudrais lui en témoigner ici ma sincère et profonde gratitude, ainsi que pour les utiles conseils et les amicales critiques dont il m'a souvent fait bénéficier. Monsieur le Professeur E. F. TERROINE a bien voulu s'intéresser de très près à mes recherches et j'ai souvent mis à contribution sa connaissance approfondie de la nutrition azotée : ses suggestions et ses critiques m'ont été extrêmement précieuses, il m'a toujours soutenu de ses encouragements et je le prie de trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude. A Monsieur le Professeur André MAYER, qui s'est constamment intéressé à la réalisation de ce travail et qui a bien voulu lui accorder l'hospitalité de ces « Annales », j'adresse également l'expression de ma vive reconnaissance. Ce m'est un agréable devoir que de remercier aussi le Conseil d'Administration de la Cais-

se Nationale de la Recherche Scientifique : l'aide matérielle qu'il n'a cessé de m'accorder m'a seule permis de venir à bout d'une tâche absorbante, difficilement compatible avec les exigences d'un enseignement.

Parmi les recherches exposées dans la première partie, celles qui on trait à la sexualité ont été effectuées en collaboration avec A. VEILLET, que je suis heureux de remercier ici pour son amical concours. Je dois la souche de *Drosophile* utilisée comme matériel pour la deuxième partie à l'obligeance de mes amis Ph. LHERITIER et G. TEISSIER qui ont accepté d'en assurer l'entretien et m'ont bien souvent fait profiter de leur expérience. Enfin je voudrais, en terminant, remercier Mlles R. RICHARD et J. M. DUREY, qui ont prêté à l'exécution de ce travail un précieux concours matériel.

PREMIERE PARTIE.

Esquisse d'une analyse biométrique et physiologique de la carence en lysine et en cystine Etude sur le Rat et sur la Souris.

Introduction et Historique.

L'étude des besoins nutritifs comporte deux tâches principales : la détermination des principes alimentaires indispensables et de leurs proportions optimum dans la ration, l'analyse de leur rôle dans l'organisme ; la première tâche, qui est celle du biochimiste, est la plus aisée ; le travail du physiologiste commence ensuite, quand les principes alimentaires ont été isolés et définis. L'histoire des vitamines nous offre un bon exemple de cette distinction : nous connaissons maintenant avec précision la composition et la structure de la plupart d'entre elles et la part de l' « indéterminé alimentaire » se réduit chaque jour ; par contre l'analyse physiologique des avitaminoses en est encore à ses débuts.

Le contraste apparaît plus net encore, si nous considérons l'analyse qualitative du besoin d'azote. En ce domaine, la détermination des principes indispensables (acides aminés) est aujourd'hui, à une seule exception près, portant sur la valine, entièrement achevée ; mais les expériences consistent seulement en des pesées d'animaux ou en la mesure d'un bilan azoté global : l'animal est toujours considéré comme un simple réactif de la nécessité ou de la non-nécessité de tel ou tel composé ; sur le rôle des acides aminés dans l'organisme, sur les modifications internes qui surviennent au cours des carences, nous ne savons à peu près rien. Il est à cela plusieurs raisons : les carences en acides aminés ne présentent pas l'intérêt pratique des avitaminoses, soit pour l'éleveur, soit pour l'hygiéniste et le médecin ; leurs effets ne sont pas aussi appa-

rents ; leur obtention exige de longs, patients et coûteux efforts.

Cependant leur intérêt théorique est indéniable. Pour s'en tenir aux acides aminés indispensables à la seule croissance, qui font l'objet de ce travail, l'étude des carences en lysine et en cystine touche à d'importants problèmes : peut-on maintenir un jeune animal en entretien véritable ? Sinon, distinguera-t-on, sous un équilibre apparent, des phénomènes de croissance partielle de certains organes, de régression d'autres organes ? dans quelle mesure ces phénomènes dépendent-ils, soit de l'âge, soit de la taille atteinte ? Les acides aminés indispensables à la croissance sont-ils nécessaires en tant que matériaux de l'édifice protéique (les « Bausteine » de KOSSEL) ou plutôt, en intervenant, comme des sortes d'« hormones externes », dans la régulation de la croissance et de la rétention azotée ? quels sont leurs rapports avec les hormones de croissance de l'organisme ? autant de questions que le présent travail ne prétend sans doute pas résoudre, mais dont il permettra peut-être de mieux préciser l'énoncé.

Avant d'en indiquer sommairement le plan, il convient de signaler les quelques tentatives déjà esquissées dans le même sens ; leur énumération sera brève : au reste, on trouvera dans la revue critique de TERROINE une bibliographie exhaustive des travaux antérieurs à 1933.

En ce qui concerne la cystine, l'attention des chercheurs a surtout été attirée sur la formation des phanères, dont cet amino-acide est un important constituant. La méthode usuelle consiste à provoquer une carence partielle, soit par l'emploi d'un aliment naturel pauvre en cystine (BEADLES, BRAMANN et MITCHELL [6], soit en fournissant un aliment riche, en quantité insuffisante, comme le font SMUTS, MITCHELL et HAMILTON [61]. On fait deux lots des animaux : l'un demeure tel quel, l'autre reçoit un supplément quotidien de cystine ; le poids du poil formé par unité de surface est toujours plus élevé chez les animaux supplémentés : il semble grossièrement proportionnel à l'ingestion de cystine, tant que celle-ci est insuffisante ; passé le seuil minimum, le poids du poil devient indépendant de l'extra-cystine ingérée, Selon LIGHTBODY et LEWIS [45], la composition chimique du poil serait, elle aussi, sous la dépendance du régime, le poil des animaux carencés étant plus pauvre en soufre et en cystine, et ces variations correspondraient à une kératinisation insuf-

fisante et inégalement répartie. Tel n'est sans doute pas le seul effet de la carence en cystine : si la kératinisation du poil était seule perturbée, les animaux continueraient de grandir, avec un pelage plus clairsemé ; il semble qu'on se soit attaché là, à un problème intéressant, mais accessoire. Certaines expériences récentes le montrent bien : MARTIN et GARDNER [47] ont fait une intéressante étude physiologique du Rat « hairless » : on sait que les rats affectés de ce gène sont presque glabres ; par ailleurs, ils ne sont pas cystinuriques ; toute la cystine qu'ils absorbent normalement est sans doute consacrée à une fonction autre que la formation du poil ; l'adjonction au régime mixte ordinaire d'un supplément de cystine, ou mieux encore, de cystéine, entraîne une poussée de croissance du poil. La fonction générale, de nature inconnue, dans laquelle intervient la cystine, est probablement exagérée chez le Rat « hairless », d'où la nécessité, pour la formation du poil, d'un apport de cystine supplémentaire. Sur la nature de cette fonction générale, nous sommes réduits aux hypothèses : rappelons seulement une curieuse expérience de WHITE [69], qui réussit à augmenter considérablement le besoin de cystine, en ajoutant à la ration alimentaire de l'acide cholalique ; selon cet auteur, le groupe cystine-méthionine bloquerait dans l'organisme l'acide cholalique, qui représente d'ailleurs une étape normale du catabolisme, pour en faire de l'acide taurocholique. S'il en était ainsi, cette fonction de blocage et de désintoxication assurerait à la cystine un rôle important dans l'entretien. Il ressort par ailleurs de mes propres recherches qu'une carence relative en cystine, telle qu'on en peut obtenir par l'emploi de protides déficients, semble laisser intacts la plupart des processus physiologiques dont l'apparition marque les diverses étapes de la croissance : le rôle fonctionnel de la cystine, s'il existe, ne requiert pas de grandes quantités de cet acide aminé.

Dans une autre direction, les travaux de LEE et LEWIS [43] constituent un premier essai d'étude chimique de la carence en cystine : elle abaisserait la teneur en soufre non protéique de tous les organes étudiés (foie, rein, muscle) ; le soufre protéique, lui, demeurerait inchangé ; la diminution du soufre non-protéique fait songer au glutathion et au rôle, encore très hypothétique, qu'on lui a attribué dans la croissance.

Nos connaissances sur la carence en lysine ne sont pas

beaucoup plus étendues ni plus précises. La teneur en lysine particulièrement élevée des protides du lait a, dès l'abord, attiré l'attention sur les effets de la carence en lysine sur la sécrétion lactée. Dans leurs anciennes expériences sur le Rat, OSBORNE et MENDEL [51] avaient constaté que ni la lactation, ni la croissance du nourrisson n'étaient troublées par la carence maternelle. Ces auteurs employaient comme protéine, une gliadine assez impure et encore riche en lysine (1,2 p. 100). Reprenant la même étude avec plus de rigueur, HART, NELSON et PITZ [31] employèrent la zéine, supplémentée en tryptophane. Ils obtinrent une gestation normale aboutissant à des nouveau-nés viables, mais la lactation s'arrêta presque aussitôt après la naissance ; l'adjonction de lysine au régime provoqua une amélioration notable, mais la croissance resta toujours inférieure à la normale : selon les auteurs, la zéine n'aurait été qu'en partie assimilée. On peut se demander aussi s'il n'y avait pas dans la zéine un facteur limitant autre que la lysine (peut-être la thréonine de ROSE). Un travail récent de FOWLER, MORRIS et WRIGHT [27], sur la Vache, confirme les résultats des recherches précédentes, effectuées sur le Rat, et montre que la teneur en lysine des divers régimes alimentaires naturels est le principal facteur limitant de la production laitière.

Un autre ensemble de recherches, dues à COURRIER et à ses collaborateurs, met en évidence des différences notables dans le comportement des divers tissus ; COURRIER et RAYNAUD [18] étudient les fonctions génitales chez les animaux carencés en lysine : cet acide aminé ne paraît pas indispensable au fonctionnement de l'appareil génital mâle et la spermatogénèse s'effectue normalement chez le Rat carencé ; par contre, chez la femelle, le cycle oestrien n'apparaît pas naturellement ; les auteurs le font apparaître par implantation abdominale d'hypophyse de rat, mais ils ne peuvent déterminer si la carence agit directement sur l'oestrus, ou si elle exerce une influence indirecte par l'intermédiaire des gonadostimulines de l'hypophyse.

La cellule néoplasique (sarcome de JENSEN du Rat) a également fait l'objet des recherches de COURRIER et COSTES [17] et d'un important travail de COSTES [16]. Comparant les exigences nutritives du tissu cancéreux et des tissus normaux, l'auteur greffe une tumeur transmissible et spécifique (sarcome de JENSEN) à des rats carencés en lysine. En employant

la gliadine comme source d'azote, on obtient une prolifération, très ralentie mais indéniable, du sarcome, le poids total de l'ensemble (animal + tumeur) demeurant constant. Cette légère croissance de la tumeur peut être due à la faible quantité de lysine (0,33 p. 100 selon l'auteur), apportée par la gliadine. Une autre série d'expériences, où la zéine, supplémentée en tryptophane, fournit un apport protéique rigoureusement exempt de lysine, porte sur trop peu d'individus pour que les résultats en soient décisifs. Il semble cependant que la tumeur ne puisse croître qu'aux dépens de l'organisme; la prolifération s'expliquerait par un simple transfert de lysine, sans qu'il y ait lieu d'admettre une différence de nature entre les besoins des tissus normaux et ceux des tissus néoplasiques.

L'ensemble de nos connaissances sur les carences en lysine et en cystine est, on le voit, fragmentaire et restreint. Aussi ai-je jugé utile de commencer cette étude par une analyse biométrique sommaire, qui nous donnera une idée d'ensemble sur l'« architecture » des animaux carencés. La présente étude comprendra quatre parties, d'inégale longueur : après un bref chapitre, consacré aux méthodes et techniques expérimentales, une comparaison des proportions relatives des organes dans les deux carences, suivie d'une étude physiologique de divers processus (involution thymique, ossification, fonctionnement génital), constitue le deuxième chapitre ; le troisième chapitre a trait aux interactions des carences avec les effets des principales hormones qui règlent la croissance et la reproduction (hormone de croissance antéhypophysaire, hormone thyroïdienne, prolans). Enfin le quatrième et dernier chapitre est consacré aux effets de la carence maternelle en lysine ou en cystine sur la gestation, la lactation et la croissance relative des organes du nourrisson.

CHAPITRE PREMIER.

MÉTHODES ET TECHNIQUES.

Les recherches sur les acides aminés indispensables portent d'ordinaire sur un petit nombre d'individus : c'est tout à fait suffisant si l'on veut seulement observer l'arrêt de la croissance ou la chute du poids ; d'ailleurs la difficulté de préparation de certains régimes artificiels rend souvent impossible l'emploi d'un matériel plus nombreux. Les exigences sont plus sévères dans les recherches d'ordre biométrique : la nécessité d'éliminer les effets de la variation individuelle oblige à examiner de nombreux individus ; de plus, lorsqu'il s'agit de phénomènes lents et continus (croissance relative de nombreux organes, ossification, variation de la teneur en eau des tissus) l'étude expérimentale doit être prolongée plusieurs mois. Aussi me suis-je astreint à la méthode, apparemment ingrate mais nécessaire, qui consiste à n'effectuer qu'un petit nombre d'expériences de longue haleine, portant chacune sur un grand nombre d'individus. La méthode générale consiste à arrêter la croissance d'un lot d'animaux en les privant de lysine ou de cystine, à vérifier sur quelques individus, par la supplémentation, que la carence est bien spécifique, et à comparer aux animaux carencés un lot témoin d'animaux parvenus naturellement au même poids, et par conséquent beaucoup plus jeunes : les différences entre les deux lots traduisent assez fidèlement les modifications survenues dans les rapports biométriques au cours de la carence. La mise en train des carences est échelonnée, ainsi que le sacrifice des animaux, de manière à avoir des temps de carence égaux.

L'étude porte principalement sur le Rat, avec quelques compléments relatifs à la Souris. Ces deux espèces, fort voisines en apparence, diffèrent notablement par l'allure de la croissance générale et de la croissance relative des organes ; elles sont donc susceptibles d'être comparées. Il eût été désirable d'opérer sur des lignées pures ; quelques essais préliminaires sur un tel matériel (Rat albino du « Wistar Institute », souche de souris albinos de Bagg) m'ont amené à y renoncer. Ces souches, assez fragiles, sont trop sensibles à des variations accidentelles, indépendantes de la constitution chimique du régime ; il arrive trop fréquemment aux animaux

de souche « inbred » de mal s'adapter au passage de l'alimentation mixte naturelle à un régime artificiel même adéquat. Cet inconvénient se fait particulièrement sentir dans un travail d'ordre statistique : je me suis donc contenté d'un « inbreeding » relatif ; dans toutes mes expériences, les animaux carencés et les animaux témoins proviennent, pour chaque expérience, de croisements frère $\times$ sœur poursuivis durant deux générations.

L'ensemble de l'élevage a été constamment maintenu à la température de $\pm 20^{\circ} \text{C.} \pm 1^{\circ}$; les animaux étaient logés dans des cages individuelles à double fond, pour éviter la coprophagie ; seuls les animaux en parfait état de santé ont été retenus pour les mesures d'organes.

La préparation des régimes artificiels et les techniques de mesure des organes seront décrites successivement.

1) Composition et préparation des régimes artificiels.

SELS MINÉRAUX. — J'ai employé dans toutes mes expériences, à raison de 4 p. 100 de la ration totale, le mélange salin d'OSBORNE et MENDEL [53], composé et préparé comme suit :

Carbonate de potassium : 141 g.,3 — Carbonate de calcium : 134 g.,8 — Carbonate de sodium : 34 g.,2 — Carbonate de magnésium : 24 g.,2 — Citrate ferrique : 6 g.,34 — Acide orthophosphorique : 103 g.,2 — Acide chlorhydrique : 53 g.,4 — Acide sulfurique : 9 g.,2 — Acide citrique : 111 g.,10 — Iodure de potassium : 0 g.,02 — Sulfate de manganèse : 0 g.,079 — Fluorure de sodium : 0 g.,24 — Alun de potassium cristallisé : 0 g.,025.

On fait dissoudre l'acide citrique dans le mélange des trois autres acides, on incorpore au liquide la poudre constituée par les carbonates et le citrate ferrique, et l'on ajoute de l'eau distillée jusqu'à formation d'une pâte homogène à laquelle on mélange les quatre derniers constituants en solution dans 30 cm³ d'eau. La pâte est desséchée à $\pm 105^{\circ} \text{C.}$ dans un thermostat, puis pulvérisée. Ce mélange, complexe et équilibré, satisfait aux besoins minéraux. Les métaux indispensables qui n'y figurent pas (zinc, cuivre, etc...) sont sans doute apportés à l'état d'impuretés par les divers éléments du régime.

LIPIDES. — Pour plus de simplicité et contrairement à l'usage général, la ration ne comporte pas de lipides ; l'apport énergétique ternaire est constitué presque uniquement par les glucides. On pourrait faire à cette simplification du ré-

gime une grave objection : depuis les travaux des BURR [8, 9], d'EVANS [22] et de leurs collaborateurs, il est devenu classique d'admettre que l'acide linoléique est un composé indispensable, dont le Rat ne peut effectuer la synthèse. L'absence de lipides dans le régime entraînerait donc une carence secondaire, en acide linoléique, dont les effets interféreraient avec ceux de la carence principale. Mais la nécessité de l'acide linoléique est encore assez incertaine (cf. les résultats en sens opposé de DRUMMOND et GREGORY) ; par ailleurs, selon BURR et EVANS les effets de la carence en acide linoléique (arrêt de croissance, troubles rénaux) ne se produisent que très tardivement et ne risqueraient guère d'interférer avec les effets immédiats des carences azotées ; de plus, mes régimes artificiels contiennent, en quantité non négligeable, (0,5 p. 100), les lipides servant de solvants aux facteurs A. D. E. La levure de bière apporte également une petite quantité de lipides. Enfin, et cela seul suffirait, les animaux carencés reprennent la croissance jusqu'à la taille adulte, lorsqu'on ajoute à la ration l'acide aminé manquant.

GLUCIDES. — Ce sont 1°) le saccharose (18 p. 100 de la ration dans tous les régimes), destiné à rendre appétissante une nourriture par ailleurs insipide, 2°) l'amidon (58 à 70 p. 100 de la ration, selon le régime) qui représente l'essentiel de l'apport énergétique. La Souris digère assez mal l'amidon de pomme de terre cru ; dès que je l'ai constaté, j'ai employé exclusivement l'amidon de maïs de POULENC, très assimilable à l'état cru par les deux espèces (Rat et Souris).

VITAMINES. — Leur présence en abondance est indispensable, la carence devant être strictement spécifique de l'acide aminé étudié. Les facteurs liposolubles A et D sont fournis sous forme de « Vitadone », solution huileuse biologiquement titrée et contenant, par centimètre cube, 800 unités internationales de vitamine A (sous forme de carotène ou provitamine) et 0 mg.,1 de vitamine D cristallisée. La ration contient 0,45 p. 100 de « Vitadone », ce qui, pour une ingestion moyenne de 7 à 8 g. de nourriture par jour, représente un apport surabondant de facteurs A et D. Le facteur liposoluble E n'est pas indispensable à la croissance, mais, pour éviter toute perturbation accidentelle dans l'évolution des gonades, je l'introduis, sous forme d'huile de germe de blé (0,05 p. 100 de la ration totale).

Parmi les facteurs hydrosolubles, le facteur C n'est néces-

saire, ni pour le Rat, ni pour la Souris. Par contre, les divers facteurs du groupe B doivent être fournis ; seules, dans ce groupe, l'aneurine, la lactoflavine et l'adénine ont été isolées jusqu'à ce jour : restent divers facteurs, présents dans la levure, mal déterminés, mais indispensables. Aussi ai-je préféré introduire dans le régime l'ensemble des facteurs du groupe B, sous forme brute de levure de bière : j'ai employé la levure sèche de BYLA, (équivalente à environ 5 fois son poids de levure fraîche) au taux de 1,5 p. 100 de la ration totale. Cette dose n'est pas surabondante, vu la teneur en glucides des régimes, mais elle est suffisante et je m'y suis tenu pour ne pas élever outre mesure l'apport protéique indéterminé de la levure. L'apport azoté indéterminé provient principalement de la levure : tenant compte de la teneur en protides de la levure sèche (15 p. 100 environ), on voit que la levure (au taux de 1,5 p. 100 de la ration totale) apporte environ 0,23 p. 100 de protides, il est vrai particulièrement riches en lysine (environ 10 p. 100 des protides totaux). Quant à l'amidon de maïs employé, il contient 0,1 p. 100 environ d'impuretés protéiques : au taux de 60 p. 100 de la ration totale, il apporte donc 0,06 de protides. Le saccharose pur et le mélange salin n'en contiennent pas. L'apport total de protides indéterminés est d'environ 0,3 p. 100 de la ration totale. Les dosages directs d'azote confirment ce chiffre : dans le régime à base de gliadine employé pour réaliser la carence en lysine, j'ai dosé directement l'azote total apporté par l'ensemble des constituants autres que la gliadine. J'ai trouvé 0 g.,04 N. pour les 82 g. de constituants non protéiques. Comme on le voit, cet apport azoté peut être considéré comme négligeable, les quantités de lysine et de cystine exigées pour la croissance étant assez notables (0,2 à 0,4 p. 100 de la ration totale).

CHARGE. — On recourt d'ordinaire à un « aliment encombrant » (papier-filtre, agar-agar, sciure de bois) pour régulariser l'évacuation intestinale. Mon expérience, au cours de ce travail, m'a montré qu'une ration contenant plus de 50 p. 100 d'amidon cru est assez lentement digérée pour qu'il ne soit pas nécessaire d'y adjoindre une charge inerte ; je n'en ai jamais usé et n'ai presque jamais observé de troubles intestinaux.

PROTIDES. — Leur choix et leur purification constituent une partie essentielle de ce travail :

Carence en lysine.

Pour la réaliser, j'avais le choix entre deux protides qui ne se trouvent ni l'un ni l'autre tout préparés, la zéine du maïs (qu'il faut compléter en tryptophane) et la gliadine du blé ; toutes deux appartiennent au groupe naturel des prolamines ; la zéine ne contient pas du tout de lysine et serait assurément préférable ; mais les protides du maïs ne se trouvent pas dans le commerce séparés de l'amidon, comme le gluten du blé, et il faut traiter directement la farine de maïs, qui est très pauvre en zéine ; l'extraction est longue et coûteuse et le rendement final (2 p. 100 environ) trop faible pour que la zéine puisse servir à des expériences prolongées sur un nombreux matériel. J'ai donc été amené à utiliser la gliadine, dont la teneur en lysine varie de 0,3 à 1,2 p. 100, selon les auteurs et leur technique de dosage. L'individualité des divers protides du blé est loin d'être définie avec la même précision que celle de l'édestine ou de l'ovalbumine : par « gliadine », j'entends la fraction du gluten de froment soluble à froid dans l'alcool éthylique à 70°. La gliadine n'étant pour moi qu'un moyen d'obtenir une carence relative en lysine, il me suffit de contrôler, par la supplémentation, la spécificité de la carence, sans me préoccuper d'une définition plus poussée de la gliadine utilisée. Je me contente donc d'opérer dans des conditions aussi constantes que possible, à partir d'un gluten toujours de même provenance et contrôlé, la teneur en « gliadine » des divers glutens variant naturellement avec les races de blé. Il existe plusieurs techniques de préparation, ne différant que par des détails ; j'ai combiné celle d'OSBORNE et MENDEL [51] et celle de COSTES [16]. Un kilogramme de gluten sec de POULENC est traité à froid, avec agitation fréquente, pendant 72 heures, par 8 litres d'alcool à 70° ; on exprime le liquide sirupeux à travers une toile fine, on laisse déposer 48 heures, on filtre sur tamis à travers plusieurs couches alternées de gaze et d'ouate, et l'on décante plusieurs fois jusqu'à clarification complète ; le liquide visqueux est alors concentré au cinquième, puis versé dans dix volumes d'eau froide, salée à 0,5 p. 100. Une partie de la gliadine peut être recueillie aussitôt à la surface, en flocons gluants, le reste se dépose entièrement en 24 heures. L'ensemble est lavé à l'eau douce, puis redissous dans l'alcool à 70° jusqu'à formation d'un liquide épais ; on précipite encore deux fois la gliadine par l'eau salée ; après la troisième précipitation, la gliadine, lavée et séchée à l'air, est traitée par l'éther pour enle-

ver les lipides, puis desséchée à poids constant dans un thermostat à $+ 100^{\circ}$ C. et finement moulue. Le produit terminal, obtenu avec un rendement de 18 à 22 p. 100 à partir du gluten, est une poudre jaune pâle, relativement pauvre en lysine. Sur deux échantillons de 100 g. prélevés chacun sur des lots homogènes de 1 kg., j'ai effectué un dosage de lysine, par la technique de VICKERY et LEAVENWORTH [67] (hydrolyse chlorhydrique, élimination de l'acide chlorhydrique par l'argent, précipitation argentique de l'arginine et de l'histidine, élimination de l'ammoniaque, précipitation phosphotungstique de la lysine, formation du picrate de lysine insoluble et dosage pondéral). J'ai trouvé respectivement 0,47 p. 100 et 0,41 p. 100, mais vu l'imprécision de la technique dont les erreurs par défaut peuvent atteindre 15 à 20 p. 100, je crois raisonnable de me borner à une seule décimale et, tenant compte de l'erreur par défaut, d'attribuer au produit employé une teneur approximative de 0,6 p. 100 de lysine. Bien entendu, il s'agit là d'une simple estimation.

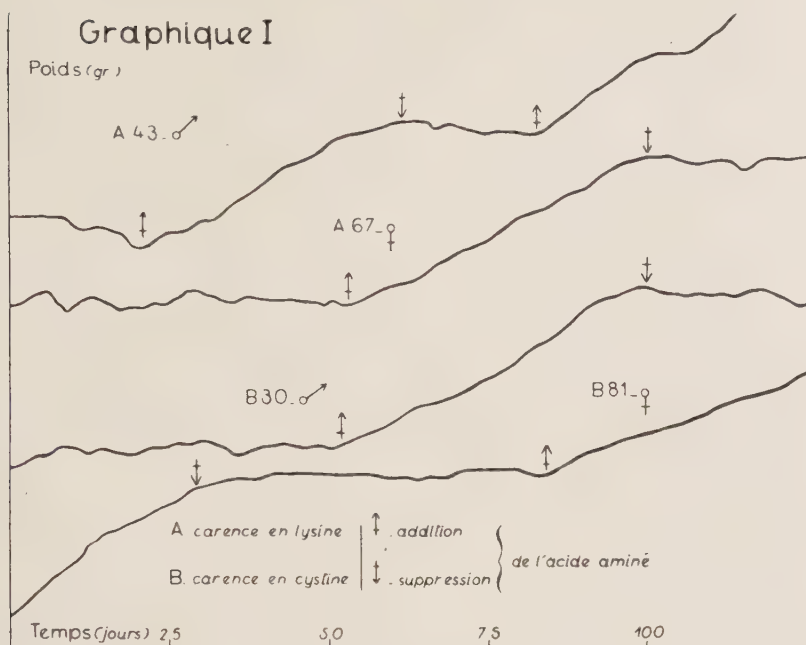
Carence en cystine.

Il ne suffit pas ici de considérer la teneur des protides en cystine : la découverte récente de la méthionine a modifié les données du problème ; cet amino-acide peut donner naissance à la *I*(-)-cystine, en se dégradant dans l'organisme ; il faut donc tenir compte de la somme (cystine + méthionine) contenue dans les divers protides naturels ; c'est ainsi que la caséine, extrêmement pauvre en cystine (0,25 p. 100), cède à l'hydrolyse environ 3,5 p. 100 de méthionine, ce qui explique qu'elle puisse assurer l'entretien à un très faible taux (6 p. 100 de la ration totale). Dans une série d'expériences, relatives à l'étude biométrique de la carence en cystine, j'ai précisément eu recours à la caséine, à ce taux de 6 p. 100 ; j'employais la caséine floconneuse soluble de POULENC, sorte de caséinate de sodium, assez pauvre en thio-amino-acides pour réaliser l'arrêt de croissance. Par la suite, désirant étudier l'effet de la carence maternelle sur la croissance du nourrisson, j'ai crain, en usant de la caséine à faible dose, d'introduire une insuffisance azotée globale, à un moment de la croissance où le besoin d'azote est particulièrement intense ; j'ai eu recours, pour ces expériences, ainsi que pour l'étude du cycle génital dans la carence en cystine, à une technique plus rigoureuse. Les protides du Haricot sont particulièrement pauvres en cystine et en méthionine : mais la farine de Hari-

cot doit subir une dénaturation par la chaleur, comme l'ont montré FINKS et JOHNS. [26] pour que la phaséoline puisse être assimilée par le Rat. La farine de Haricot, chauffée à 100°, et présente dans la ration au taux de 72 p. 100, assure l'entretien, mais non la croissance ; il faut ajouter 0,5 p. 100 de l (-) cystine pour rétablir la croissance. J'ai employé, à la dose bien plus faible de 45 p. 100 seulement, une farine de Haricot de composition suivante (protides 21,6 p. 100 ; lipides 2,1 p. 100 ; glucides 62,6 p. 100), réalisant ainsi une carence spécifique en cystine. L'ensemble (farine de Haricot, saccharose, amidon, et mélange salin d'OSBORNE et MENDEL) était chauffé 30 minutes avec de l'eau, à l'autoclave à 115° C. On ajoutait à la pâte après refroidissement, la « Vitadone » et un extrait hydro-alcoolique de levure sèche.

MÉLANGE DES CONSTITUANTS. — On le réalise d'ordinaire en malaxant au mortier les divers éléments ; j'ai eu recours à un procédé plus simple et plus rapide : un cube métallique creux, de 10 cm. de côté, porte sur une de ses faces une ouverture rectangulaire, que l'on peut obturer hermétiquement par un petit volet ; le cube peut tourner autour d'un axe horizontal métallique, qui le traverse de part en part, selon une grande diagonale ; on introduit dans le cube les poudres à mélanger et l'on fait tourner l'axe lentement (40 à 60 tours par minute) ; au bout de 2 à 3 minutes, le mélange est parfaitement homogène (on peut le vérifier en traitant ainsi pendant le même temps un mélange d'amidon et de charbon en poudre : on obtient une poudre grise d'apparence homogène). Le mélange pulvérulent est ensuite malaxé avec de l'eau et on y ajoute les vitamines liposolubles. La pâtée ainsi préparée est conservée à basse température (5 à 6° C.) et renouvelée au moins tous les trois jours. La nourriture des animaux est renouvelée tous les jours, ainsi que l'eau de boisson, donnée à volonté.

SUPPLÉMENTATION. — Pour vérifier la spécificité des carences, j'ai supplémenté les régimes déficients, tantôt par le bichlorhydrate de l (+) lysine de HOFFMANN LA ROCHE, exactement neutralisé, au moment de l'emploi, par du bicarbonate de sodium, tantôt par la l (—) cystine de HOFFMANN LA ROCHE. Quelques courbes de croissance individuelles, réunies à titre d'exemple dans le graphique 1, montrent les effets des carences et de la supplémentation.



Courbes de croissance individuelles d'animaux recevant un régime déficient en lysine ou en cystine, avec alternatives d'addition et de suppression de l'acide aminé.

2) Techniques de mesure.

Les animaux, carencés et témoins, tués par anesthésie à l'éther environ 24 heures après la dernière ingestion de nourriture, sont aussitôt pesés, à 0 g.,01 près, pour les animaux de moins de 10 g., à 0 g.,1 près pour les autres, puis disséqués dans une solution physiologique de TYRODE, de composition suivante : NaCl : 8 g., KCl : 0 g.,2, $(\text{CaCl}_2 \ 6 \ \text{H}_2\text{O})$: 0 g.,1, $(\text{MgCl}_2 \ 6 \ \text{H}_2\text{O})$: 0 g.,1, (CO_3NaH) : 0 g.,85, $(\text{PO}_4\text{NaH}_2)$: 0 g.,05, $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)$: 1 g., H_2O : Q. S. pour 1.000 centimètres cubes.

L'erreur due à la dissection est faible : chez des animaux de même sexe, de même portée, et de même poids, la différence de poids entre organes homologues ne dépasse pas 3 p. 100. Cette constance provient de l'emploi d'une technique uniforme. L'encéphale, (comprenant les lobes olfactifs et les para-flocculi) est séparé de la moëlle épinière au niveau du premier nerf cervical, et les nerfs craniens sont sectionnés aussi près que possible de leur origine. Par « œil », je désigne le globe oculaire tout entier, débarrassé des muscles oculo-moteurs.

Le cœur est ouvert et soigneusement lavé pour enlever le sang coagulé : par « cœur », je désigne la masse ventriculaire seule, à l'exclusion des oreillettes et des vaisseaux, la masse ventriculaire étant plus aisée à délimiter que l'organe tout entier. Les reins sont débarrassés de la graisse attenante et les vaisseaux sectionnés aussi près que possible du hile. Le foie, enlevé aussitôt après la mort pour éviter qu'il n'augmente de poids par congestion, est débarrassé par une légère pression, du sang en excès. Par « poumons », j'entends l'ensemble des lobes pulmonaires isolés, à l'exclusion de la trachée et des bronches principales. Le tube digestif est ouvert longitudinalement et débarrassé de son contenu par pression, puis lavé 15 minutes dans la solution de TYRODE, avant d'être pesé ; je désigne sous ce nom l'ensemble du tractus alimentaire (moins l'œsophage), du cardia à l'anus. Par glandes salivaires, je désigne les sous-maxillaires, débarrassées des nodules lymphatiques qui les accompagnent. Les testicules sont séparés de l'épididyme et du canal déférent.

Les organes disséqués sont extraits aussitôt de la solution de TYRODE et séchés 15 secondes sur papier filtre : la rapidité du séchage empêche la perte d'eau par évaporation, même pour les petits organes ; il peut y avoir, par contre, erreur par excès, due à un séchage imparfait : pour en apprécier l'importance, on pèse plusieurs fois le même échantillon, en le remplaçant chaque fois dans la solution de TYRODE et en faisant varier le temps de séchage ; la variation est de 1 à 2 p. 100 seulement, pour les organes de plus de 50 mg. ; naturellement plus forte pour les petits organes (tels que surrénales, hypophyse, etc.), elle ne dépasse pas 10 p. 100, même pour des organes de moins de 10 mg. et chez de jeunes animaux encore très hydratés. Les organes sont pesés dans un récipient taré, sur une balance d'analyses, à 0 g.,0001 près. Ils sont ensuite desséchés jusqu'à poids constant, dans un thermostat à $+ 96^{\circ}$ C, les températures plus élevées risquant d'amener une erreur par excès, due à l'oxydation des graisses. Les mesures de longueur, portant sur des pièces osseuses, ont été effectuées, à 0 mm.,1 près, à l'aide d'un pied à coulisse.

L'énoncé des résultats individuels m'eût amené à grossir démesurément l'exposé de ce travail : j'ai publié seulement des chiffres moyens, qui résultent d'une analyse statistique des données numériques individuelles. Ces nombres moyens, qui expriment les valeurs caractéristiques d'un lot entier,

sont toujours suivis de l'erreur-type, ce qui permet d'apprécier l'importance des différences entre les animaux expérimentés et les témoins. Je rappelle à ce propos que, si l'on connaît les erreurs-types de deux constantes statistiques (a) et (b), soit (σa) et (σb) , il suffit de calculer l'expression

$$\sqrt{(\sigma a)^2 + (\sigma b)^2},$$

pour avoir l'erreur-type de la différence $(a - b)$. Connaissant, d'une part la valeur de la différence $(a - b)$, et d'autre part l'erreur-type $\sigma (a - b)$, on admet que la différence entre les deux constantes est significative, si l'erreur-type de la différence, $\sigma (a - b)$, est contenue au moins *trois* fois dans la différence elle-même. Il y a dans ce cas 370 chances contre 1 pour que les échantillons étudiés proviennent de populations distinctes et, dans le cas qui nous occupe, pour que la différence entre les deux moyennes (expérimentés et témoins), ne soit pas le fait du hasard. Pour une différence égale à *quatre* fois l'erreur-type de la différence, il y aurait 17.000 chances contre 1. Ces données statistiques sont d'ailleurs classiques, je les ai rappelées seulement pour indiquer sur quel critère reposent les conclusions de mes recherches.

Tout au cours de ce travail, j'ai fréquemment eu à consulter la précieuse monographie de DONALDSON [19] sur le Rat : cet ouvrage contient un grand nombre de données numériques recueillies à partir d'un nombreux matériel, souvent par l'auteur lui-même ou ses collaborateurs : il m'a souvent servi de référence ; en tous cas, les chiffres que m'ont fournis les animaux témoins présentent une remarquable concordance avec les chiffres de DONALDSON pour les animaux de même poids.

L'étude du cycle génital au cours des carences, effectuée en collaboration avec A. VEILLET, nous a amenés à user de la technique histologique : nous nous sommes bornés aux procédés les plus classiques (fixation aux liquides de BOUIN ou de ZENKER, coloration des pièces à l'hémalum-éosine, ou à l'hématoxyline ferrique pour l'étude de la spermatogénèse), notre intention étant seulement de nous assurer, par une étude sommaire de l'anatomie microscopique, de l'intégrité des fonctionnements génitaux les plus importants, sans entrer dans les détails cytologiques.

Enfin, les techniques particulières, utilisées dans divers cas, seront citées au fur et à mesure de l'exposé.

CHAPITRE II.

ÉTUDE BIOMÉTRIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DES CARENCES.

L'étude de la croissance relative, d'abord purement descriptive, tend à devenir expérimentale : pour modifier la relation entre la masse d'un organe et la masse totale de l'organisme, on peut, soit accélérer la croissance globale, soit la retarder ou l'arrêter. MOMENT [49] accéléra la croissance du Rat, par un apport surabondant de facteurs B, et compara les proportions relatives des Rats à croissance rapide à celles de témoins normaux sans trouver d'ailleurs beaucoup de différences. La plupart des auteurs s'attachèrent, au contraire, à retarder la croissance ; les premières tentatives consistèrent simplement à diminuer l'apport alimentaire total (JACKSON et STEWART [36]) : la déficience ainsi réalisée était extrêmement complexe ; les expériences d'avitaminose, en privant l'animal d'un seul aliment indispensable, constituèrent un progrès notable : depuis les anciennes recherches de LOPEZ-LOMBA [46], divers travaux furent consacrés à l'étude des proportions relatives des organes chez des animaux privés de telle ou telle vitamine. Mais les acides aminés indispensables à la croissance conviennent mieux que les vitamines à une étude de ce genre : les animaux privés de lysine ou de cystine présentent un arrêt de croissance simple, se prolongeant plusieurs mois sans aucune modification pathologique. L'étude biométrique des carences en lysine et en cystine nous renseignera sur la véritable nature de cet arrêt de croissance. Y a-t-il conservation des proportions relatives au cours de la carence ? dans ce cas, le maintien du poids serait le signe extérieur d'un entretien véritable, et les carences en lysine et en cystine seraient un moyen commode de séparer, chez un jeune animal, le besoin énergétique d'entretien du besoin de croissance (on sait combien cette distinction a occupé les physiologistes, sans qu'on ait jamais pu maintenir en véritable entretien un

animal en âge de croître). Dans le cas contraire, la variation des proportions relatives nous permettrait de tirer diverses conclusions sur la répartition des matériaux alimentaires entre les différents organes et tissus.

1) Etude biométrique.

a) LA CARENCE EN LYSINE.

α) Chez le Rat.

Une première série de recherches a trait à la carence en lysine chez le Rat de 80 à 90 grammes. 23 Rats albinos de même souche (11 mâles, 12 femelles), âgés de 60 jours et pesant initialement $84 \text{ g.}, 3 \pm 1,5$, furent soumis, durant 115 jours, au régime artificiel suivant : Gliadine de blé 18 p. 100 ; Amidon 58 p. 100 ; Saccharose 18 p. 100 ; Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL 4 p. 100 ; Levure sèche 1,5 p. 100 ; Extrait de vitamines liposolubles 0,5 p. 100. L'arrêt de croissance fut immédiat. Tous les animaux survécurent en bon état, et à la fin de l'expérience le poids moyen du lot fut $88 \text{ g.}, 6 \pm 2,4$. Un autre lot de 9 animaux de la même souche (4 mâles, 5 femelles) fut soumis durant le même temps au régime supplémen-té suivant : Gliadine 17,46 p. 100 ; 1 (+) lysine 0,54 p. 100. Autres constituants : sans modifications. Le poids final de ce lot fut de $226 \text{ g.}, 8 \pm 7,9$: la carence était donc bien spécifique. A la fin de l'expérience, j'ai comparé les poids frais et secs et les teneurs en eau d'un certain nombre d'organes des animaux carencés, avec ceux des organes homologues, prélevés sur un lot de 21 animaux de même souche, parvenus au même poids ($88 \text{ g.}, 2 \pm 1,9$) que les animaux carencés, mais par suite de leur croissance naturelle, et par conséquent beaucoup plus jeunes (63 jours au lieu de 175).

Pour apprécier les changements survenus au cours de la carence, il me fallait comparer l'état final des animaux carencés, tel que je pouvais l'observer directement, à leur état initial. Ne pouvant bien entendu connaître celui-ci directement, j'ai choisi des témoins représentant aussi exactement que possible l'état initial des animaux carencés, à savoir : des animaux plus jeunes, parvenus naturellement au même poids et sacrifiés à ce stade de leur croissance.

On aurait pu songer également à comparer les animaux ca-

rencés à des témoins de même âge ; mais les expériences de carence étant de longue durée, les témoins de même âge auraient atteint la taille adulte, tandis que les animaux carencés seraient restés en palier. La comparaison des deux lots m'aurait évidemment révélé d'importantes différences dans les proportions relatives des organes. Mais ces différences n'auraient fait que traduire les classiques relations d'allométrie, car l'on sait depuis longtemps que le poids relatif d'un organe donné n'est pas le même chez un adulte et chez un animal de taille deux fois moindre.

Pour présenter quelque intérêt, la comparaison avec des témoins de même âge aurait dû porter sur plusieurs séries d'animaux, carencés durant des temps variés et comparés chaque fois à des témoins de même âge. On aurait pu déterminer ainsi les lois de la croissance relative pour ceux des organes qui continuent à croître chez les animaux carencés et les comparer à celles de la croissance normale. Une telle tâche, qui n'est d'ailleurs pas sans intérêt, exigerait un matériel considérable et pourrait faire à elle seule l'objet d'un travail particulier. Aussi me suis-je dans tous les cas limité à une comparaison avec des témoins de même poids que les animaux carencés.

On trouvera au tableau 1 les résultats numériques de cette expérience : les deux sexes sont réunis pour le calcul du poids moyen des divers organes somatiques, une analyse statistique préliminaire m'ayant montré l'absence de différences sexuelles significatives.

De la comparaison des poids frais dans les deux groupes, on peut tirer les conclusions suivantes : il existe une différence significative pour les reins, les testicules, les ovaires, les yeux, les glandes salivaires, le thymus, la rate, le cœur, les poumons ; la différence n'est pas significative pour le foie, le tube digestif, l'encéphale, l'hypophyse, les surrénales. Tout un ensemble d'organes très divers (reins, testicules, glandes salivaires, rate, cœur, poumons, yeux) augmentent de poids au cours de la carence ; au contraire, le thymus et les ovaires diminuent de poids, et la musculature régresse légèrement, fournissant vraisemblablement les matériaux nécessaires à l'accroissement des organes précédents. De leur côté le système nerveux central et les organes essentiels de la nutrition (tube digestif et foie) demeurent en équilibre. Les accroissements de poids observés ne se réduisent pas à une simple hy-

TABLEAU I.
Carence en lysine chez le Rat (poids d'organes en mg.).

Organes	Animaux carencés			Témoins			Nature de la différence entre les animaux carencés et les témoins
	Poids frais	Poids sec	Teneur subst. sèche en p. 100	Poids frais	Poids sec	Teneur subst. sèche en p. 100	
Reins (2)	1393 ± 63,8	238,2 ± 11,1	17,1	872 ± 48,7	181,4 ± 8,7	20,8	S +
Testicules (2)	1497 ± 47,4	202,1 ± 10,3	13,5	1132 ± 39,8	144,9 ± 7,6	12,8	S +
Ovaires (2)	15,1 ± 0,9	—	—	19,5 ± 0,8	—	—	S —
Yeux (2)	229 ± 6,7	49,8 ± 2	21,7	190 ± 6,1	32,3 ± 1,9	17	S +
Encéphale	1612 ± 68,9	332,2 ± 12,7	20,7	1649 ± 70,3	343 ± 13,4	20,8	N.S.
Hypophyse	♂ 4,2 ♀ 6,02	—	—	♂ 4,1 ♀ 5,8	—	—	N.S.
Foie	5508 ± 221	1366 ± 54,1	24,8	5527 ± 243	1392,8 ± 48,9	25,2	N.S.
Tube digestif	5394 ± 240	1024,8 ± 44	19	5627 ± 221	1080,4 ± 41,8	19,2	N.S.
Gl. saliv.	384 ± 30,1	70,4 ± 7,1	18,3	206 ± 24,5	37 ± 5,6	18	S +
Thymus	66,3 ± 3,9	13,4 ± 1	20,2	250,4 ± 14,3	47,6 ± 2,4	19	S —
Cœur	469,8 ± 20,3	99,6 ± 3	21,2	381 ± 14,8	82,3 ± 2,6	21,6	S +
Poumons	952,8 ± 45,4	169,6 ± 8,1	17,8	615 ± 32,7	116,9 ± 6,2	19	S +
Rate	482,3 ± 42,3	96 ± 4,7	19,9	265 ± 30,8	53 ± 3,9	20	S +
Surrénales	♂ 21 ♀ 26,7	—	—	♂ 20,7 ♀ 26,2	—	—	N.S.
Muscle tibial antérieur	243,9 ± 10,3	61,3 ± 2,1	25,1	317,6 ± 14,8	79,2 ± 2,9	24,3	S —

S + : Accroissement significatif. S — : Diminution significative. N.S. : Différence non significative.

dratation : il y a aussi augmentation du poids sec, donc véritable croissance. Les teneurs en eau sont sensiblement les mêmes, chez les animaux carencés et chez les témoins : font cependant exception, le rein, qui conserve chez les animaux carencés une teneur en eau élevée, les yeux, dont la déshydratation se poursuit avec l'âge, et le système osseux, comme nous le verrons par la suite. Le cas du thymus sera examiné à part.

Une autre expérience fut entreprise sur des Rats beaucoup plus jeunes, pour voir si les modifications internes dues à la carence, ne dépendaient pas de l'âge et de la taille des animaux au début de l'expérience. Celle-là porta sur 20 Rats (10 mâles, 10 femelles), pesant en moyenne $42\text{ g},5 \pm 1,3$ et âgés de 41 jours. Ces animaux, sevrés depuis peu, reçurent le même régime artificiel carencé que les précédents. Tous survécurent, sauf un ; à la fin de l'expérience (76^e jour), leur poids moyen était de $44\text{ g},8 \pm 2,5$. La comparaison avec un lot témoin de 17 animaux de même souche, ayant atteint naturellement un poids moyen de $45\text{ g},4 \pm 1,8$, est donnée au tableau II, pour quelques organes ; les résultats confirment ceux de la première expérience.

TABLEAU II.

Carence en lysine chez le jeune Rat (poids d'organes en mg.).

Organes	Animaux carencés		Témoins	
	Poids frais	Poids sec	Poids frais	Poids sec
Reins	$738 \pm 37,6$	$121,8 \pm 4,8$	$502 \pm 25,2$	$101,4 \pm 3,7$
Rate	$182 \pm 9,2$	$35,5 \pm 1,5$	$128 \pm 6,1$	$24,9 \pm 1,2$
Cœur	$291 \pm 9,3$	$60,5 \pm 1,5$	$249 \pm 7,2$	$52,5 \pm 1,4$
Poumons	$498 \pm 24,3$	$94,6 \pm 4,2$	$360 \pm 15,9$	$68,7 \pm 3,3$
Foie	3268 ± 139	$777,8 \pm 35,9$	3230 ± 128	$772 \pm 36,5$
Encéphale	1425 ± 57	295 ± 11	$1443,5 \pm 55,3$	$292,6 \pm 10,2$
Yeux	$160,1 \pm 5,2$	$24,8 \pm 1,1$	$136,4 \pm 4,6$	21 ± 1
Testicules	$448,5 \pm 23,5$	$57,8 \pm 2,5$	$328 \pm 19,6$	$43 \pm 2,3$
Tube digestif	3204 ± 191	$585,9 \pm 32$	$3158 \pm 172,5$	$578 \pm 29,9$

Pour les organes qui continuent à croître, l'accroissement relatif est moindre que dans l'expérience précédente, la carence ayant duré moins longtemps. La croissance partielle de la rate et du testicule est un peu moins rapide, phénomène sans doute en rapport avec l'âge des animaux.

β) *Chez la Souris.*

J'ai voulu comparer à l'ensemble des résultats précédents, les chiffres que j'ai obtenus sur la Souris. Les deux espèces appartiennent au même genre et, hormis la différence de taille, les systématiciens ne les distinguent que par de minimes caractères morphologiques (callosités plantaires). Par contre l'étude de la croissance relative fait ressortir d'importantes différences. TEISSIER [65], utilisant les chiffres de DONALDSON [19], a montré l'existence de deux « stades critiques » (changements brusques des relations d'allométrie concernant les divers organes), dans la croissance relative du Rat : le premier se place vers l'âge de 13 à 14 jours et affecte des animaux d'environ 15 grammes, l'autre se rapporte à des Rats d'environ 90 g. âgés de 70 jours. J'ai moi-même étudié, dans un travail antérieur [37], la croissance relative de la Souris et mis en évidence *un seul* stade critique net, vers le 25-30^e jour, pour un poids de 6 à 7 g.. La première discontinuité de la croissance du Rat précède d'une semaine au moins le sevrage, la deuxième correspond à la puberté. L'unique stade critique de la Souris suit d'une semaine le sevrage. Chez le Rat, le poids total décuple après le sevrage, il quadruple seulement chez la Souris. Il y a de plus, de nombreuses différences, concernant les relations allométriques, même pour des organes homologues. Une comparaison des deux espèces était donc souhaitable.

31 Souris de même souche, âgées de 30 jours (ayant donc dépassé depuis peu le stade critique unique) furent soumises au même régime que les rats des précédentes expériences. La carence dura 91 jours et la mortalité fut beaucoup plus élevée que chez le Rat (23 survivantes seulement sur 31) ; de plus, il n'y eut pas arrêt total de la croissance, et le lot carencé s'éleva de $8 \text{ g.,}09 \pm 0,12$ à $11 \text{ g.,}09 \pm 0,5$, ce qui, relativement au poids initial, est assez notable. Le besoin de lysine est-il moins grand chez la Souris que chez le Rat ? C'est peu probable : des expériences inédites, dans lesquelles j'avais tenté, re-

TABLEAU III.

Carence en lysine chez la Souris (poids d'organes en mg.)

Organes	Animaux carencés				Témoins			Nature de la différence entre les animaux carencés et les témoins
	Poids frais	Poids sec	Teneur subst. sèche en p. 100		Poids frais	Poids sec	Teneur subst. sèche en p. 100	
Foie.	859 $\pm$ 42,3	215,4 $\pm$ 11,5	25		635,9 $\pm$ 31,2	131,4 $\pm$ 6,6	20,6	S +
Rein droit.	417,8 $\pm$ 5,4	20,89 $\pm$ 0,81	17,7		89 $\pm$ 4,4	15,97 $\pm$ 0,63	17,9	S +
Testicule droit.	55 $\pm$ 3,2	9,8 $\pm$ 0,41	17,8		39 $\pm$ 2,5	6,07 $\pm$ 0,78	15,5	S +
Thymus.	14,9 $\pm$ 1,5	3,25 $\pm$ 0,32	21,8		27,9 $\pm$ 2,6	5,75 $\pm$ 0,6	20,6	S -
Rate.	40,5 $\pm$ 4,8	8,2 $\pm$ 1	20,2		69,9 $\pm$ 5,4	14,4 $\pm$ 1,7	20,1	S -
Cœur.	60,5 $\pm$ 2,4	13,5 $\pm$ 0,5	22,3		61,2 $\pm$ 2,2	12,8 $\pm$ 0,54	20,9	N. S.
Tr. digest.	525,9 $\pm$ 25,8	95 $\pm$ 5,4	18		492,4 $\pm$ 20,9	88,1 $\pm$ 4,7	17,9	N. S.
Glandes salivaires.	54,9 $\pm$ 5,1	12,4 $\pm$ 2	22		57,7 $\pm$ 3,1	11,1 $\pm$ 0,6	19,2	N. S.
Encéphale.	423 $\pm$ 6,9	76 $\pm$ 1,4	17,9		419,4 $\pm$ 7,2	75,4 $\pm$ 1,3	17,9	N. S.
Poumons.	102,7 $\pm$ 4	18 $\pm$ 0,6	17,5		103,3 $\pm$ 4,2	16,5 $\pm$ 0,7	15,9	N. S.
Œil droit.	17,8 $\pm$ 0,9	3,7 $\pm$ 0,15	20,7		12,6 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 0,09	19	S +

S + : Accroissement significatif. S - : Diminution significative.

N. S. : Différence non significative.

prenant une étude déjà effectuée par JACKSON et STEWART [36] sur le Rat, d'arrêter la croissance de la Souris, en me contentant de réduire l'apport énergétique et en couvrant par ailleurs, autant que possible, les besoins qualitatifs, m'ont montré qu'il est extrêmement difficile de conserver à poids constant une jeune Souris en âge de croître. Cette espèce s'adapte fort bien à des réductions successives de l'apport énergétique ; de plus, la zone de maintien doit être extrêmement étroite (l'animal croît ou dépérit). Peut-être en est-il de même pour le besoin de lysine et la Souris carencée s'adapte-t-elle sans doute au nouveau régime, en améliorant le rendement de l'assimilation et de la rétention de lysine. Quoi qu'il en soit, j'ai comparé les animaux carencés à un lot témoin de souris de même souche, parvenues naturellement, à l'âge de 38 jours, au même poids que le poids *final* des Souris carencées ($11 \text{ g.}, 35 \pm 0,4$). Les résultats, provenant d'animaux mâles seulement, sont rassemblés au tableau III.



La principale différence entre la Souris et le Rat réside dans l'importance relative des remaniements intérieurs ; ils sont bien plus limités chez la Souris : le cœur, les poumons, les glandes salivaires demeurent en équilibre. Par ailleurs la rate diminue de poids, tandis qu'elle s'accroît chez le Rat ; le foie, au lieu de demeurer stationnaire, s'accroît notablement et sa teneur en substances sèches s'accroît aussi, ce phénomène correspondant en partie à un enrichissement en glycogène (teneur du foie frais de l'animal à jeun, en sucres réducteurs, exprimés en glucose, après hydrolyse acide : pour les témoins 1,9, pour les animaux carencés 3,2. Moyenne de 5 mesures dans chaque cas). Ces différences sont notables et inattendues ; mais j'ai déjà rappelé que les organes homologues du Rat et de la Souris n'ont pas les mêmes lois de croissance relative, il n'est donc pas étonnant que leur comportement au cours d'une même carence soit différent. Il existe cependant certains traits communs : chez les deux espèces, le rein et le testicule poursuivent leur croissance, aux dépens du reste de l'organisme, ainsi que l'œil. Il y a là sans doute une propriété des organes indépendante de l'espèce.

A ce propos, il convient de remarquer que l'aptitude à croître ou à régresser, relativement à la masse totale de l'organism-

me, n'est pas une propriété de tel « tissu », au sens histologique du mot : le tissu nerveux de l'encéphale demeure stationnaire, tandis que celui de l'œil s'accroît, ainsi que le muscle lisse du globe oculaire, tandis que le muscle lisse du tube digestif reste en équilibre. Certains organes (rein, testicule) présentent un accroissement de masse, sans modification de structure, ce qui suppose la croissance concordante de tissus variés. En fait, un certain nombre d'organes et d'appareils tout entiers se comportent au cours de la carence avec un certain « degré de liberté » par rapport au reste de l'organisme ; et les proportions relatives des organes peuvent varier, de façon assez notable, sans que les fonctionnements essentiels soient compromis.

Naturellement, il y a entre les divers organes et tissus de multiples interactions et l'on conçoit, par exemple, que le maintien en équilibre d'un organe ou d'un tissu puisse empêcher l'accroissement de plusieurs autres : au cours de la carence, le renouvellement de l'épithélium digestif s'effectue continuellement, mais, la musculature demeurant en équilibre, la muqueuse ne peut s'accroître, bien qu'ayant conservé intacte sa capacité mitotique.

A quoi correspondent, du point de vue morphologique, les accroissements partiels des divers organes ? On sait que, chez le Rat, la mitose s'arrête très tôt pour les « éléments nobles », vers le 20^e jour pour les neurones de l'écorce cérébrale (ST-GITA [63], vers le 30^e jour pour la fibre musculaire striée (MORPURGO [50]). Les mitoses des tissus hépatique, rénal, et de diverses glandes s'arrêtent un peu plus tard, mais vers le 40^e jour, la mitose n'affecte pratiquement plus que les épithéliums. L'accroissement de masse et de volume des organes correspond donc à un simple accroissement des dimensions cellulaires, sans que les expériences précédentes permettent de préjuger de l'effet des carences en lysine et en cystine sur les mitoses de croissance.

L'étude de la carence en cystine nous permettra de compléter les résultats précédents et de faire le départ des effets particuliers de chaque carence et des phénomènes qui traduisent une réaction de tel ou tel organe, commune aux deux carences.

b) LA CARENCE EN CYSTINE.

La très faible teneur en lysine du groupe naturel des prolamines rend relativement aisée l'obtention de la carence en lysine ; il en va autrement pour la cystine, présente à des taux variés dans tous les protides naturels. OSBORNE et MENDEL [52], dans leurs premières recherches, eurent recours à la caséine, constituant, à raison de 6 p. 100 de la ration totale, le seul protide du régime alimentaire ; ils purent ainsi arrêter la croissance et la rétablir par simple adjonction de cystine, à la dose de 0,4 p. 100 de la ration totale (la caséine ne contenant que 0,25 p. 100 de cystine, l'apport apparent de cystine par la caséine était très faible : 0,015 p. 100 de la ration totale). Mais l'apport indirect de cystine, par dégradation de la méthionine dans l'organisme, ne doit pas être négligé, car la teneur de la caséine en méthionine est assez élevée (3,5 p. 100). C'est sans doute ce qui explique qu'ayant repris les expériences d'OSBORNE et MENDEL, j'ai observé seulement un ralentissement considérable de la croissance globale mais non pas un véritable arrêt. J'aurais pu sans doute abaisser encore le taux de la caséine dans la ration, mais alors des facteurs limitants autres que le groupe cystine-méthionine seraient entrés en jeu ; je me serais trouvé en présence d'une carence complexe, dont les effets n'auraient pu être interprétés.

Une première expérience porta sur 25 Rats (13 mâles, 12 femelles), âgés de 29 jours et pesant $31 \text{ g.}, 7 \pm 0,6$, qui furent soumis au régime suivant : Amidon 70 p. 100 ; Saccharose 18 p. 100 ; Caséine purifiée 6 p. 100 ; Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL 4 p. 100 ; Levure sèche 1,5 p. 100 ; Extrait de vitamines liposolubles 0,5 p. 100. Bien que ce régime fut pauvre en azote, l'arrêt de croissance fut provoqué par le manque de cystine et non par une insuffisance protéique globale ; pour m'en assurer, je donnai, durant 150 jours, le régime précédent supplémente par 0,4 p. 100 de l(—) cystine, à 6 Rats (3 mâles, 3 femelles), provenant des mêmes portées que les Rats carencés ; ces animaux passèrent de 30 g.,5, au 30^e jour à 221 g.,7 au 180^e jour ; la cystine était donc le seul facteur limitant, et la carence était bien spécifique. Quant aux animaux carencés, ils atteignirent en 210 jours, le poids moyen de $101 \text{ g.}, 2 \pm 6,3$. On remarquera la variabilité du poids final : selon les individus, il peut y avoir, pour le même régime, arrêt presque

TABLEAU IV.

Carence en cystine chez le Rat. — Régime à base de caséine (poids d'organes en mg.).

Organes	Animaux carencés			Teneur subst. sèche en p. 100	Témoins			Teneur subst. sèche en p. 100	Nature de la différence entre les animaux carencés et les témoins
	Poids frais	Poids sec	Teneur subst. sèche en p. 100		Poids frais	Poids sec	Teneur subst. sèche en p. 100		
Œil droit.....	119 ± 3,6	23,4 ± 0,7	19,6	99 ± 2,1	16,8 ± 0,2	16,9	S +		
Rein droit.....	642 ± 24	111 ± 2,6	17,2	477 ± 15	99 ± 1,9	20,7	S +		
Foie.....	5350 ± 198	1172 ± 46	24,9	6083 ± 152	1580 ± 39	25,9	S —		
Tr. digest.....	4890 ± 173	878 ± 39	17,9	6327 ± 140	1260 ± 32	19,9	S —		
Testicule droit.....	633 ± 17	85,6 ± 2,3	13,5	759 ± 13	98,9 ± 1,8	13	S —		
Rate.....	227 ± 13	44,9 ± 2,3	19,7	283 ± 12	56,6 ± 2,2	20	S —		
Thymus.....	72,8 ± 3,7	15,5 ± 0,8	21,2	270 ± 16	55,2 ± 3,1	20,4	S —		
Hypophyse.....	3,7 ± 0,3	—	—	♂ 1,5 ± 0,2 ♀ 6,2 ± 0,4	—	—	S —		
Encéphale.....	1749 ± 31	344,4 ± 5,8	19,6	1685 ± 24	353,5 ± 4,9	20,9	N.S.		
Surrénales.....	22,7 ± 1,3	—	—	♂ 24,4 ± 0,9 ♀ 28,7 ± 1	—	—	S —		
Cœur.....	437 ± 11,4	88,7 ± 2,9	20,2	456 ± 12,6	98,7 ± 3,2	21,6	N.S.		
Poumons.....	657 ± 15	117,1 ± 4,8	17,8	675 ± 15,3	128 ± 5,2	18,9	N.S.		
Gl. saliv.....	280,7 ± 7,2	51,2 ± 1,4	18,2	223 ± 8,5	44,8 ± 1,7	20	S +		

S + : Accroissement significatif. S — : Diminution significative. N.S. : Différence non significative.

S + : Accroissement significatif.

S — : Diminution significative.

N.S. : Différence non significative.

complet ou simple ralentissement de la croissance. L'action de la carence est en tout cas très nette, le poids moyen atteint au 8^e mois étant celui d'un Rat de 70 jours environ. C'est à un lot témoin de 21 animaux de cet âge (73 jours), appartenant à la même souche et parvenus naturellement au même poids ($102 \text{ g.}, 3 \pm 2,1$) que les animaux carencés, que je me suis adressé pour la comparaison. On trouvera les résultats au tableau IV.



Le rein, l'œil et les glandes salivaires continuent à croître et sont plus lourds chez les animaux carencés que chez les témoins, le rein garde une teneur en eau élevée ; le foie, le tractus digestif, la rate, les surrénales, l'hypophyse, présentent au contraire un retard, et même pour ces dernières glandes, un arrêt de la croissance. La différence sexuelle caractéristique qui s'instaure au deuxième stade critique de la croissance relative (l'hypophyse et les surrénales étant plus lourdes chez la femelle) n'existe pas chez les animaux carencés. Le foie est plus riche en eau chez les animaux carencés que chez les témoins. La carence semble également retarder la croissance du testicule : mais c'est seulement un effet de la pauvreté en azote du présent régime et non un effet spécifique de la carence en cystine. On peut en effet comparer, aux résultats précédents, ceux d'une expérience de contrôle effectuée ultérieurement, avec une source azotée différente, sur 19 Rats, âgés de 35 jours, pesant $39 \text{ g.}, 1 \pm 1,2$, qui furent soumis durant 47 jours au régime suivant : Farine de Haricot 45 p. 100 ; Amidon 31,5 p. 100 ; Saccharose 18 p. 100 ; Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL 4 p. 100 ; Extrait hydroalcoolique de levure sèche (1 cm^3 correspondant à 2 g. de levure initiale) 1 p. 100 ; Extrait de vitamines liposolubles 0,5 p. 100. Ces animaux sont comparés, au tableau V, à 18 Rats témoins, de même souche, parvenus naturellement, au 44^e jour d'âge, à un poids moyen de $52 \text{ g.}, 4 \pm 2$, tandis que les Rats carencés atteignaient, au 82^e jour, un poids de $51 \text{ g.}, 1 \pm 1,9$. Le ralentissement de la croissance est plus net qu'avec le précédent régime à base de caséine, bien que l'apport azoté global soit ici beaucoup plus élevé : cela tient sans doute à ce que les protéides du Haricot apportent moins de cystine que la caséine, soit directement, soit par l'intermédiaire de la méthionine.

TABLEAU V.

*Carence en cystine chez le jeune Rat (régime à base de haricot :
(poids d'organes en mg.).*

Organes	Animaux carencés		Témoins		Nature de la différence entre les animaux carencés et les témoins
	Poids frais	Poids sec	Poids frais	Poids sec	
Œil droit.....	91,5 ± 3,4	16,2 ± 0,8	76,3 ± 2,4	11,7 ± 0,6	S +
Rein droit.....	366,4 ± 16,1	62,1 ± 1,7	285 ± 12,8	54,9 ± 1,3	S +
Foie.....	3261 ± 80,7	697,9 ± 18,4	3724 ± 90,4	899,7 ± 22,9	S —
Testicule dr....	291,3 ± 16,2	37,6 ± 1,9	204,5 ± 12,1	26,6 ± 1,6	S +
Rate.....	121,8 ± 4,8	23,7 ± 1	157,3 ± 5,9	30,9 ± 1,2	S —
Thymus.....	45,3 ± 1,8	8,9 ± 0,5	152 ± 12,5	28,9 ± 2,3	S —
Surrénales....	12,9 ± 0,4	—	15,4 ± 0,5	—	S —
Hypophyse.....	2 ± 0,16	—	2,9 ± 0,18	—	S —

On voit que la carence n'empêche pas la croissance du testicule, à condition qu'il y ait un apport suffisant d'azote. Pour les autres organes, les variations sont de même sens que chez les animaux nourris à la caséine et sont donc caractéristiques de la carence en cystine, établie ainsi par deux procédés différents. Ainsi, selon la carence et l'espèce étudiée, le partage des matériaux alimentaires s'effectue diversement entre les organes ; dans tous les cas cependant, le rein et l'œil se comportent en systèmes privilégiés, qui poursuivent leur croissance au détriment du reste de l'organisme.

Ces données sur la « hiérarchie des organes » sont à rapprocher de faits tout récemment mis en évidence par J. ROCHE et ses collaborateurs [60] : ces auteurs constatent qu'une fois entré dans la phase prémortelle (perte de plus de 20 p. 100 de l'azote total), le Rat soumis à l'inanition protéique n'est plus capable de redressement physiologique, même si l'on couvre de nouveau tous les besoins azotés : le Rat retient alors de l'azote, mais perd du poids et finalement, meurt ; or, durant cette période de réalimentation azotée, le rein et le cœur reconstituent une partie de leurs protides, tandis que le foie s'en montre incapable. Dans le cas présent, il n'y a pas chute de poids ou perte d'azote, mais seulement arrêt global de la

croissance, avec persistance de la croissance pour un certain nombre d'organes. Nous devons tenter de rendre compte de ces importants remaniements internes.

Une première interprétation consisterait à attribuer à la lysine et à la cystine un rôle purement « fonctionnel » de régulateur de la croissance et de stimulant de la rétention azotée : on comprendrait alors la persistance de croissances partielles anarchiques, en l'absence de ces acides aminés. En raisonnant ainsi, on ne ferait qu'étendre à la lysine et à la cystine les conceptions modernes de l'école américaine sur les acides aminés indispensables à l'entretien : ceux-ci apparaissent plutôt comme des sortes d'hormones externes que comme des matériaux de remplacement destinés à réparer l'usure des tissus. Parmi eux, le mieux étudié à ce point de vue, le tryptophane, doit être fourni souvent et à faible dose (BERG et ROSE), comme s'il intervenait continuellement dans quelque mécanisme très labile. Le Rat carencé en tryptophane peut cependant effectuer la gestation complète, réparer les pertes d'hémoglobine provoquées par la saignée; et l'ampleur de ces phénomènes est telle qu'on ne peut les expliquer par de simples transferts (ALCOCK [3]).

Cela amène à distinguer deux parts dans le tryptophane métabolisé : la première, destinée à prendre part à l'édification des tissus, pourrait être synthétisée ; la deuxième, jouant le rôle d'une hormone externe, telle quelle ou à un état défini de dégradation, devrait être fournie en nature. La perte de poids ne serait qu'une conséquence secondaire du non-fonctionnement de ce mécanisme « hormonal », ou interviendrait le tryptophane. Etendant à la lysine et à la cystine les vues originales d'ALCOCK [4], on peut se demander si ces acides aminés n'interviendraient pas, eux aussi, dans quelque mécanisme humoral (par exemple dans la formation des hormones qui président à la croissance). Cette interprétation aurait l'avantage d'unifier nos conceptions sur les acides aminés : nous verrons par la suite que les faits ne paraissent pas la confirmer.

Si l'on admet par contre que la lysine et la cystine sont nécessaires en tant que matériaux de construction des tissus, on pourrait expliquer la persistance des croissances partielles chez les animaux carencés, de deux manières.

On pourrait penser, comme l'a fait COSTES [16] pour le tis-

su néoplasique, que les besoins alimentaires diffèrent selon les tissus et les organes. Acceptable s'il s'agit d'une différence de degré, cette interprétation ne serait plus admissible si l'on postulait une différence de nature dans les besoins : les mêmes tissus entrent, à des degrés divers dans la constitution de nombreux organes, tous contiennent et tous exigent, en proportions diverses, de la lysine et de la cystine pour leur accroissement.

On pourrait enfin, avec plus de simplicité et de vraisemblance, admettre des transferts de lysine ou de cystine d'un organe à l'autre. Pour expliquer la libération de ces acides aminés, on peut, soit admettre l'hypothèse d'une hydrolyse totale d'une certaine quantité de protéines tissulaires, soit supposer une dislocation et un remaniement des protéines, semblable à celui que Madame A. ROCHE [57] a mis en évidence dans ses recherches sur le changement de constitution des protéines musculaires, au cours du jeûne azoté. L'auteur, opérant sur une fraction bien définie du muscle, composée à peu près uniquement de protides (poudre de muscle desséchée, dégraissée, débarrassée de glycogène et de sels solubles par extraction à l'eau acétique bouillante), est amené aux conclusions suivantes : certains acides aminés (arginine, histidine, cystine) demeurent en proportions constantes dans les protides musculaires ; d'autres au contraire (tryptophane, tyrosine et surtout *lysine*) sont en moindre proportion chez les animaux ayant subi l'inanition protéique. Ces faits, caractéristiques du jeûne *azoté*, et traduisant un véritable remaniement des protides, ne se retrouvent pas dans le jeûne total.

Il eût été évidemment d'un très grand intérêt de poursuivre des recherches de cet ordre sur les animaux carencés que j'étudiais. Malheureusement, l'imprécision des méthodes de dosage, en ce qui concerne la lysine, est encore telle (15 à 20 p. 100 d'erreur) que j'ai craint d'aboutir à des résultats incohérents et non-significatifs ; cette imprécision de la méthode directe avait contraint Mme A. ROCHE à estimer la teneur en lysine des protides du muscle, par différence, (après calcul de l'azote diaminé total, d'une part, et de la somme arginine + histidine + cystine, d'autre part) sans qu'on pût déterminer avec certitude, si l'azote restant correspondait bien à la seule lysine. Quelques dosages de lysine par la métho-

de directe (technique de VICKERY et LEAVENWORTH), effectués sur les muscles desséchés d'animaux carencés et de témoins, m'ont donné des chiffres ne pouvant fournir aucune conclusion. Aussi n'ai-je pas voulu m'engager dès maintenant dans la technique délicate de préparation des protides musculaires isolés, tant que le dosage de la lysine ne pourra être effectué plus rigoureusement par la méthode directe. On peut toutefois, d'après les résultats de Mme A. ROCHE, voir dans la lysine un amino-acide particulièrement mobilisable et facilement libéré de la molécule protéique, ce qui permettrait un transfert aisé d'un organe à l'autre, au cours de la carence, sans impliquer pour cela une fonte protéique considérable. Il n'en est pas de même pour la cystine : comme l'ont montré LEE et LEWIS [43], la teneur en soufre des protides de divers organes (muscle, foie, rein) ne varie pas dans la carence en cystine ; et cela s'accorde bien avec les résultats de Mme A. ROCHE, la cystine demeurant constante au cours de l'inanition protéique ; par contre, selon les auteurs américains, la teneur en soufre non-protéique diminue au cours de la carence ; la variation porte sur l'extractif alcoolique, qui représente surtout une forme d'équilibre entre les protides des organes et le milieu intérieur ; il est possible que, dans la carence en cystine, il faille, à l'inverse de ce qui se passerait dans la carence en lysine, une hydrolyse totale d'une certaine quantité de protides pour libérer la cystine nécessaire à la croissance de certains organes. En tout cas, la possibilité de tels emprunts de cystine aux tissus pour satisfaire à des mécanismes fonctionnels qui s'accomplissent coûte que coûte a été clairement démontrée chez la Poule par ACKERSON et BLISH : ces auteurs ont constaté que chez les Poules en inanition protéique, une certaine quantité de tissus était nécessairement détruite au moment de la mue pour fournir la cystine nécessaire à la rénovation du plumage. Rappelons seulement que le foie diminue de poids au cours de la carence en cystine : J. ROCHE et ses collaborateurs voient précisément dans le foie, une réserve de protides mobilisables au cours de l'inanition protéique ; peut-être y a-t-il au cours de la carence en cystine mobilisation et hydrolyse d'une partie des protides du foie, c'est un point qui mériterait d'être précisé.

Quoi qu'il en soit, vu la difficulté d'une étude biochimique

que nous ne savons pas encore comment aborder, je me suis limité à une analyse biométrique des carences en lysine et en cystine, qui pourra servir de point de départ à une étude biochimique ultérieure, me bornant, quant aux causes et à la nature des remaniements observés, à la critique des diverses hypothèses.

A cette analyse va succéder l'étude sommaire de quelques processus physiologiques, qui ont pour caractère commun de dépendre assez étroitement de l'âge atteint par l'animal : à savoir, l'involution du thymus, l'ossification, l'instauration et le déroulement de l'activité génitale. L'accomplissement de ces divers processus, qui, d'ordinaire, est particulièrement lié au facteur temps, est-il troublé par l'arrêt de croissance ? Si oui, il faudrait en conclure que tous les processus du développement sont liés, dans une certaine mesure, à la taille atteinte par l'organisme. Dans le cas contraire, on aurait, dans ces processus, une mesure assez exacte du vieillissement de l'organisme, indépendamment de tout phénomène de croissance.

2) Etude physiologique de quelques processus liés à l'âge.

a) L'INVOLUTION DU THYMUS.

La croissance du thymus, en fonction de l'âge et du poids corporel, a été soigneusement étudiée, par HATAI [32] et par JACKSON [35], chez le Rat. TEISSIER [65] a exprimé en coordonnées logarithmiques les résultats de ces auteurs et constaté, dans la relation qui unit le poids du thymus à celui de l'organisme, l'existence de deux discontinuités. La première, marquée par un simple décrochement de la courbe de croissance relative correspond au premier stade critique de la croissance générale ; la deuxième correspond à la puberté et est marquée par l'arrêt de croissance du thymus, qui demeure quelque temps stationnaire, puis décroît en fonction de l'âge, cependant que la masse totale de l'organisme s'accroît. La plupart des auteurs qui ont observé un arrêt de croissance général pour une cause quelconque (inanition partielle, avitaminoses diverses), signalent une régression du thymus, qui par sa richesse en nucléoprotides, jouerait le rôle d'une réserve azotée ; il est en tout cas particulièrement frappé dans les diverses carences à effets pathologiques. Il était intéressant de consacrer à cet organe une étude spéciale, dans les

TABLEAU VI.

Poids du thymus dans les carences en lysine et en cystine

Carence en lysine				Carence en cystine			
Groupe	Animaux âgés			Animaux âgés			
	Animaux carencés	Témoins même âge	Témoins même poids	Animaux carencés	Témoins même âge carencés	Témoins même poids carencés	
Poids moyen en g.	88,6 ± 2,4	220,9 ± 5,8	88,3 ± 4,9	104,2 ± 6,3	249,3 ± 8,7	102,3 ± 2,1	
Age du lot.....	475 jours	175 jours	63 jours	239 jours	240 jours	73 jours	
Poids thymus en mg.....	66,3 ± 3,9	181,7 ± 13,5	250,4 ± 14,3	72,8 ± 3,7	128,4 ± 13,4	270 ± 16	
Poids sec thymus en mg.....	13,4 ± 1	36,3 ± 2,2	47,6 ± 2,4	15,5 ± 0,8	27,3 ± 2,1	55,2 ± 3,1	
Animaux jeunes				Animaux jeunes			
Poids moyen en g.	44,8 ± 2,5	105,4 ± 2,7	45,3 ± 4,9	51,1 ± 1,9	115,3 ± 3,7	55,2 ± 2	
Age du lot.....	76 jours	75 jours	43 jours	82 jours	82 jours	44 jours	
Poids thymus en mg.....	39,9 ± 1,9	276,5 ± 14,9	134,3 ± 12	45,4 ± 1,8	287,8 ± 15,4	152 ± 12,5	
Poids sec du thymus en mg...	7,7 ± 0,4	53,7 ± 2,7	25,5 ± 2,2	8,9 ± 0,5	57 ± 2,1	28,9 ± 2,3	

carences en lysine et en cystine, qui laissent les animaux en équilibre azoté et en entretien apparent, sans aucune modification pathologique. Le tableau VI donne les poids frais et sec du thymus pour divers lots d'animaux.



Qu'il s'agisse d'animaux jeunes ou âgés, qu'ils soient carencés en lysine ou en cystine, le poids du thymus est toujours beaucoup plus faible que chez les témoins, qu'ils soient de même âge ou de même poids ; la teneur en eau demeure normale. J'ai entrepris quelques expériences de contrôle, destinées à suivre l'évolution du thymus, en sacrifiant, à des intervalles échelonnés, un ensemble d'animaux, carencés, soit en lysine, soit en cystine. Dès le début de la carence, qu'elle ait commencé vers le 30^e ou vers le 60^e jour après la naissance, qu'elle ait trait à la lysine ou à la cystine, le poids du thymus se stabilise et cet organe demeure en équilibre jusqu'au 90^e jour environ. Vers cet âge, qui marque le début de l'involution chez l'animal normal, elle commence aussi chez l'animal carencé et dépend donc uniquement de l'âge. Elle est cependant toujours plus rapide chez les animaux carencés que chez les témoins, et paraît plus rapide dans la carence en lysine que dans la carence en cystine. Cette régression du thymus avec l'âge, chez des animaux carencés et susceptibles de croître à nouveau par la suite, équivaut à une expérience naturelle de large thymectomie, sans les traumatismes considérables qui accompagnent d'ordinaire l'ablation expérimentale du thymus (: les expériences de thymectomie, même les mieux conduites, permettent difficilement de faire le départ entre l'effet de l'ablation du thymus et celui du traumatisme opératoire, même si un traumatisme présumé identique a été pratiqué chez les témoins). Nous sommes ici dans un cas privilégié et j'en ai profité pour voir s'il y avait une relation quelconque entre l'état du thymus et les possibilités de croissance : sur 10 Rats mâles, carencés en cystine depuis 9 mois et parvenus au 300^e jour de leur existence, 5 furent sacrifiés : leur thymus, en pleine régression, ne pesait plus que 43 mg.,2 en moyenne ; les 5 autres rats, pesant en moyenne 108 g.,4 reçurent alors une alimentation mixte ordinaire ; ils crurent rapidement et atteignirent en 30 jours la taille adulte (moyenne de 201 g.,9). Sacrifiés à ce moment, ils furent disséqués : leur thymus pe-

sait 37 mg.,3 seulement ; il y a tout lieu de penser qu'au début de cette croissance tardive, le thymus de ces animaux ne pesait pas plus que celui des 5 témoins, appartenant aux mêmes portées qu'eux et nourris de même ; on peut donc en inférer qu'une croissance tardive, mais assez rapide, demeure possible chez des animaux dont le thymus est pratiquement inexistant. Ce résultat indirect confirme ceux des expériences de thymectomie les plus correctement conduites, qui montrent que la suppression du thymus n'a pas d'effet sur la capacité de croissance.

b) L'OSSIFICATION.

La description histophysiologique et biochimique de l'ossification chez les rats carencés en lysine et en cystine, exigerait à elle seule, une étude particulière, qui déborderait le cadre de ce travail. Je me suis contenté de déterminer, pour divers os longs des membres (fémur, tibia, humérus et cubitus) la longueur de l'os, les poids frais et sec, la teneur en substance sèche et la teneur en cendres. Pour sommaires que puissent paraître ces données aux yeux du biochimiste, elles n'en constituent pas moins une première indication sur l'évolution du squelette au cours des carences. Je résumerai brièvement mes conclusions, après avoir rappelé les travaux antérieurs.

Du point de vue purement biométrique, la croissance en longueur et en poids de nombreux os du Rat est décrite en détail dans un long mémoire de DONALDSON et CONROW [20], et les résultats de mes mesures sur des témoins cadrent sensiblement avec les chiffres de ces auteurs. HAMMETT [30] a donné une analyse élémentaire de cendres d'os longs, à deux âges différents. Enfin le récent et important travail de Mlle GARCIA [29], appuyé sur de très nombreuses mesures, mérite une mention particulière : l'auteur distingue un tissu osseux fondamental, sorte de « masse active » de l'os, et une réserve saline, purement passive et aisément mobilisable ; un bon indice des relations entre ces deux fractions de l'os est fourni par le rapport Phosphore/Azote. GARCIA distingue deux phases dans l'ossification du Rat : la première, allant de la naissance à un poids de 110-120 grammes, est caractérisée par le développement du tissu osseux fondamental, accompagné d'ailleurs d'une minéralisation progressive de la matrice

protéique de l'os. La deuxième phase correspond à la constitution de la réserve saline, elle ne commence que lorsque le squelette a sensiblement atteint la taille finale. C'est sur la réserve saline que portent surtout les variations provoquées par divers déséquilibres alimentaires (déséquilibres salins, avitaminose D). L'auteur étudie aussi, ce qui touche de plus près à notre sujet, l'effet du jeûne azoté sur l'ossification : la structure histologique de l'os demeure normale (ce qui m'a détourné de l'étudier dans les carences en lysine et en cystine, beaucoup moins brutales que l'inanition protéique totale); la teneur en eau est élevée, relativement à celle de l'os normal, les teneurs en azote et en phosphore sont abaissées ; la déminéralisation paraît d'ailleurs être un phénomène secondaire, dû à l'acidose générale que provoque le jeûne azoté, et l'on ne peut s'attendre à de tels phénomènes dans les carences que nous étudions ici.

On trouvera rassemblés mes résultats numériques au tableau VII. La longueur des divers os a été déterminée, à 0 mm.,1 près, à l'aide d'un pied à coulisse, muni d'un vernier. Le poids frais a été mesuré, sitôt fait le prélèvement, et après avoir débarrassé l'os aussi rigoureusement que possible des fragments de muscle, tendons et capsules articulaires ; le poids sec a été obtenu par dessiccation de l'os jusqu'à poids constant dans un thermostat à $+ 96^{\circ}$. Pour avoir le poids des cendres, j'ai chauffé d'abord l'os doucement jusqu'à carbonisation, puis, après lixiviation à l'eau bouillante, je l'ai calciné sur capsule de platine, dans un four à moufle. Cette technique est simple et se prête aisément à des recherches statistiques. Elle présente, par contre, le grave inconvénient d'une erreur par défaut systématique : si la calcination augmente le taux des phosphates par oxydation du phosphore organique de l'os, elle provoque une variation inverse et beaucoup plus importante, en amenant le départ d'une partie du CO_2 des carbonates. L'erreur, il est vrai, ne dépasse pas 5 p. 100 et nous importera d'autant moins qu'il s'agit ici d'une comparaison de mesures relatives, toutes obtenues par la même technique.

TABLEAU VII.

Effet des carences sur l'ossification.
Carence en cystine (poids des os en mg.).

<i>Expérience I. — (Animaux âgés)</i>				<i>Expérience II. — (Animaux plus jeunes)</i>	
Os	Grandeur mesurée	Carencés	Témoins	Carencés	Témoins
Tibia droit	Longueur	29,9 ± 0,6	29,6 ± 0,4	24,2 ± 0,4	23,9 ± 0,5
	Poids frais.....	226,5 ± 8	235 ± 9,5	133 ± 4,9	130 ± 5,2
	Poids sec.....	172 ± 5	136 ± 6	81,8 ± 2,7	57,8 ± 2,1
	p. 100 sec.....	75,9 p. 100	57,8 p. 100	61,5 p. 100	44,5 p. 100
	Poids cendres..	112,1 ± 3,8	85,7 ± 2,9	38,2 ± 1,5	24,9 ± 1,1
	Cendres/P. sec.	65,1 p. 100	63 p. 100	46,8 p. 100	43 p. 100
Fémur droit	Longueur.....	26,9 ± 0,3	25,9 ± 0,2	20,3 ± 0,5	20,2 ± 0,3
	Poids frais.....	309,6 ± 13	285 ± 10,5	181,3 ± 7	161 ± 6,4
	Poids sec.....	199,7 ± 7,8	151,5 ± 6,4	97,5 ± 3,1	63,2 ± 2,4
	p. 100 sec.....	64,5 p. 100	53,1 p. 100	53,7 p. 100	39,3 p. 100
	Poids cendres..	127,4 ± 4,6	94,2 ± 3,8	42,7 ± 1,5	27,2 ± 0,9
	Cendres/P. sec.	63,7 p. 100	62,2 p. 100	43,7 p. 100	43,1 p. 100
Humérus droit	Longueur	20,7 ± 0,4	20,6 ± 0,4	16,7 ± 0,3	16,4 ± 0,2
	Poids frais.....	140,4 ± 4,3	141,2 ± 4,3	90,8 ± 2,8	86,3 ± 2,7
	Poids sec.....	94 ± 2,4	77,8 ± 1,9	51,9 ± 1,7	37,1 ± 1,2
	p. 100 sec.....	67 p. 100	55,1 p. 100	57,2 p. 100	43 p. 100
	Poids cendres..	62,8 ± 2	49,7 ± 1,6	25 ± 0,9	16,9 ± 0,5
	Cendres/P. sec.	66,8 p. 100	63,9 p. 100	48,2 p. 100	45,7 p. 100
Cubitus droit	Longueur.....	23,9 ± 0,5	23,9 ± 0,4	19,8 ± 0,4	19,5 ± 0,3
	Poids frais.....	59,4 ± 1,6	58,2 ± 1,2	30,6 ± 1	32,3 ± 0,9
	Poids sec.....	47,6 ± 1,3	39,6 ± 0,7	23,3 ± 0,5	17,1 ± 0,5
	p. 100 sec.....	80,1 p. 100	68 p. 100	76,1 p. 100	53,1 p. 100
	Poids cendres..	33,3 ± 0,7	26,9 ± 0,7	12,2 ± 0,4	8,6 ± 0,3
	Cendres/P. sec.	70 p. 100	68 p. 100	52,3 p. 100	50,4 p. 100

EXPÉRIENCE I. — *Caractéristiques.*

Carencés. — Moyenne de 13 mâles et 12 femelles, passés de 31 g., 7 ± 0,6 au 29^e jour, à 101 g., 2 ± 6,3, au 239^e jour.

Témoins. — Moyenne de 11 mâles et 10 femelles, de la même souche que les précédents, ayant naturellement le même poids, 102 g., 3 ± 2,1, au 73^e jour.

EXPÉRIENCE II. — *Caractéristiques.*

Carencés. — Moyenne de 10 mâles et 9 femelles, passés de 39 g., 1 ± 1,2 au 35^e jour à 51,1 ± 1,9 au 82^e jour.

Témoins. — Moyenne de 9 mâles et 9 femelles de même souche, ayant naturellement atteint le même poids, 52 g., 4 ± 2, au 44^e jour.

TABLEAU VII.

*Effet des carences sur l'ossification.
Carence en lysine (poids des os en mg.)*

<i>Expérience I. — (Animaux âgés).</i>				<i>Expérience II. (Animaux plus jeunes)</i>	
Os	Grandeur mesurée	Carencés	Témoins	Carencés	Témoins
Tibia droit	Longueur.....	29,3 $\pm$ 0,7	29,1 $\pm$ 0,5	23,2 $\pm$ 0,5	23,4 $\pm$ 0,4
	Poids frais.....	225 $\pm$ 10,3	218 $\pm$ 9,7	119,8 $\pm$ 4,9	123 $\pm$ 4,7
	Poids sec.....	165 $\pm$ 4,1	126,3 $\pm$ 3,2	69,3 $\pm$ 2,2	53,9 $\pm$ 2
	p. 100 sec.....	73,3 p. 100	58,2 p. 100	57,8 p. 100	43,8 p. 100
	Poids cendres..	106,2 $\pm$ 3	79,7 $\pm$ 2,3	30,6 $\pm$ 1,7	22,5 $\pm$ 1,3
	Cendres/P. sec.	64,4 p. 100	62,8 p. 100	44,1 p. 100	41,7 p. 100
Fémur droit	Longueur.....	25,5 $\pm$ 0,4	25,7 $\pm$ 0,5	19,7 $\pm$ 0,3	19,6 $\pm$ 0,3
	Poids frais.....	330 $\pm$ 18,5	309 $\pm$ 16,7	153 $\pm$ 6,7	149 $\pm$ 6,3
	Poids sec.....	213 $\pm$ 7,2	163,1 $\pm$ 5,1	76,2 $\pm$ 2,1	56,8 $\pm$ 1,9
	p. 100 sec.....	64,5 p. 100	52,8 p. 100	49,8 p. 100	38,1 p. 100
	Poids cendres..	134,8 $\pm$ 3,9	101,1 $\pm$ 3,2	31,6 $\pm$ 1,1	23,4 $\pm$ 0,9
	Cendres/P. sec.	63,3 p. 100	62 p. 100	41,5 p. 100	41,2 p. 100
Humérus droit	Longueur.....	20,3 $\pm$ 0,5	20,4 $\pm$ 0,4	15,7 $\pm$ 0,3	15,9 $\pm$ 0,2
	Poids frais. ...	167,9 $\pm$ 14,9	138 $\pm$ 13,1	81,4 $\pm$ 2,8	79 $\pm$ 2,9
	Poids sec.....	112,3 $\pm$ 4	75,9 $\pm$ 2,8	43,6 $\pm$ 1,7	32,7 $\pm$ 1,5
	p. 100 sec.....	66,8 p. 100	55 p. 100	53,5 p. 100	41,4 p. 100
	Poids cendres..	74,3 $\pm$ 2,3	48,3 $\pm$ 1,9	20,2 $\pm$ 0,9	14,3 $\pm$ 0,7
	Cendres/P. sec.	66,2 p. 100	63,7 p. 100	46,3 p. 100	43,7 p. 100
Cubitus droit	Longueur.....	23,6 $\pm$ 0,3	23,8 $\pm$ 0,4	19 $\pm$ 0,4	19,1 $\pm$ 0,3
	Poids frais.....	54,8 $\pm$ 1,8	53,7 $\pm$ 1,9	27,3 $\pm$ 1,2	28,6 $\pm$ 1,3
	Poids sec.....	50,9 $\pm$ 1,6	36,4 $\pm$ 1,4	19,7 $\pm$ 0,8	14,3 $\pm$ 0,6
	p. 100 sec.....	92,9 p. 100	67,8 p. 100	72,2 p. 100	50, p. 100
	Poids cendres..	34,6 $\pm$ 1,3	24,4 $\pm$ 1,1	10,1 $\pm$ 0,4	7,02 $\pm$ 0,4
	Cendres/P. sec.	68 p. 100	67,2 p. 100	51,2 p. 100	49 p. 100

EXPÉRIENCE I. — *Caractéristiques.*

Carencés. — Moyenne de 11 mâles et 12 femelles passés de 84 g.,3 $\pm$ 1,5 au 60^e jour, à 88 g.,6 $\pm$ 2,4, au 175^e jour.

Témoins. — Moyenne de 10 mâles et 11 femelles, de même souche que les précédents, ayant naturellement atteint le même poids : 88 g.,2 $\pm$ 1,9 au 63^e jour.

EXPÉRIENCE II. — *Caractéristiques.*

Carencés. — Moyenne de 10 mâles et 10 femelles passés de 42 g.,5 $\pm$ 1,3 au 41^e jour, à 44 g.,8 $\pm$ 2,5, au 76^e jour.

Témoins. — Moyenne de 9 mâles et 8 femelles de même souche, ayant naturellement atteint le même poids 45 g.,4 $\pm$ 1,8, au 43^e jour.



DISCUSSION DES RÉSULTATS. — On remarquera que les carences, soit en lysine, soit en cystine, n'ont aucune influence sur la longueur et le poids frais de l'os ; ces deux grandeurs, qui expriment assez fidèlement la taille générale du squelette, sont identiques chez les témoins et chez les animaux carencés ; poids et longueur de l'os varient uniquement en fonction du poids total de l'organisme et non de l'âge, et demeurent donc en équilibre chez les animaux carencés (ce résultat est en accord avec les observations de Mlle GARCIA). Par contre, la teneur en eau des os longs décroît régulièrement en fonction de l'âge, au cours des carences, et, chez les animaux carencés, le poids sec de l'os est, tant en valeur absolue que relativement au poids frais, beaucoup plus élevé que chez les témoins. Cette déshydratation de l'os en fonction du temps peut être considérée comme un indice assez précis de la marche de l'ossification. Mes expériences, pour les deux carences, ont porté d'une part sur des animaux très jeunes, d'autre part sur des animaux plus âgés, et les résultats sont concordants. Les animaux carencés du premier groupe (animaux âgés) atteignirent un poids final toujours inférieur à 110 grammes ($88,6 \pm 2,4$ pour les animaux carencés en lysine, $101,2 \pm 6,3$ pour les animaux carencés en cystine). Ces animaux se situent donc par leur poids dans la première des deux phases distinguées par GARCIA, phase de formation du tissu fondamental de l'os. Mais, par leur poids sec et leur teneur en substance sèche, les os de ces animaux présentent les caractéristiques de l'os adulte. L'étude des cendres renforce cette conclusion : le poids des cendres, tant en valeur absolue que relativement au poids sec de l'os, est celui de l'os adulte. Il faut donc penser que, malgré l'arrêt de la croissance globale, l'ossification s'est poursuivie, avec les phénomènes de déshydratation et de minéralisation, qui en sont le signe extérieur chez l'animal normal. Il y a eu aussi constitution de la réserve saline de l'os, malgré l'arrêt de la croissance, cette réserve étant évidemment proportionnelle en quantité à la taille où s'est arrêté l'os. Le squelette des animaux carencés a donc la taille que lui impose la carence, mais la structure et la composition chimique de l'os adulte : la marche de l'ossification est indépendante de la nature de la carence. Comment s'expliquer que des rats dont l'os est calcifié puissent croître à

nouveau et atteindre la taille adulte, lorsque le régime est supplémen-té en lysine ou en cystine ? Rappelons que chez le Rat, les cartilages de conjugaison des os longs persistent très tardivement : ainsi, d'après DAWSON, cité par DONALDSON [19], un cartilage épiphysaire est encore présent aux deux extrémités du fémur chez des Rats âgés de deux ans ; c'est ce qui explique la possibilité d'une reprise tardive de la croissance, chez les Rats soumis à des carences diverses.

L'ossification, comme l'involution thymique, s'accomplit donc en fonction de l'âge, sans être affectée par les carences en lysine et en cystine.

c) LES FONCTIONS DE REPRODUCTION.

L'étude des fonctions génitales constitue un cas plus complexe que les deux précédents.

Mes recherches sur ce sujet ont été effectuées en collaboration avec A. VEILLET et ont fait l'objet de deux publications préliminaires [41 et 42]. Pour la commodité de l'exposé, je rassemblerai les données relatives aux deux carences (lysine et cystine), en ce qui concerne l'appareil génital mâle, dont le comportement est le même dans les deux cas ; l'appareil génital femelle exigera deux études distinctes.

COURRIER et RAYNAUD [18] signalent une spermatogénèse normale chez le jeune Rat carencé en lysine, ce qui contraste avec la fragilité du mécanisme de la spermatogénèse dans la plupart des carences. Nous avons repris systématiquement cette étude, en soumettant de jeunes Rats mâles, soit à la carence en lysine (animaux de 35 jours, pesant environ 40 grammes), soit à la carence en cystine (animaux de 48 jours, pesant environ 60 grammes. Les premiers reçurent le régime suivant : Gliadine de Blé 10 p. 100 — Saccharose 18 p. 100 — Amidon 68 p. 100 — Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL 4 p. 100 —. On ajoute à 100 g. de mélange sec, 5 cm³ d'extrait hydroalcoolique de levure sèche (dont 1 cm³ correspond à 1 g. de levure initiale) et 0 g.,5 de « Vitadone » ; on remarquera le faible taux de la gliadine (10 p. 100), provoquant une carence en lysine très sévère. Pour la carence en cystine, nous avons eu recours aux protides du Haricot et nous avons constitué le régime suivant, qui est en quelque sorte une farine de Haricot réduite en protides et supplémen-tée en sels et en vitamines : Farine de Haricot 45 p. 100 — Saccharose

18 p. 100 — Amidon 33 p. 100 — Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL 4 p. 100 —. On délaye avec de l'eau et la pâte est chauffée une heure à l'autoclave à 115° C, pour dénaturer par la chaleur la phaséoline, inassimilable à l'état cru ; on ajoute ensuite, pour 100 g. de mélange sec initial, 5 cm^3 d'extrait de levure et 0 g.,5 de « Vitadone », comme pour le régime précédent. Ces deux régimes, que nous avons employés aussi pour carencer les femelles, arrêtent également bien la croissance : pour la rétablir, il suffit d'adjoindre à la ration 0,85 p. 100 de bichlorhydrate de l (+) lysine, exactement neutralisé par du bicarbonate de sodium, dans le premier cas, et dans le deuxième cas, 0,5 p. 100 de l (-) cystine.

La spermatogénèse apparaît, quelle que soit la carence, vers le 90-100^e jour : on trouve alors de nombreux spermatozoïdes dans les tubes séminifères. Les testicules peuvent atteindre un poids assez considérable par rapport au poids somatique (le testicule droit pèse 377 mg. $\pm$ 6,8 chez un lot de 11 Rats carencés en lysine, dont le poids moyen est 41 g.,6 $\pm$ 2,9 ; il atteint 501 mg.,3 $\pm$ 8,9 chez un lot de 12 Rats carencés en cystine et pesant 65 g.,4 $\pm$ 3,8). Nous avons vérifié expérimentalement la capacité fonctionnelle du testicule, en accouplant des mâles carencés, soit en lysine, soit en cystine, depuis plus de 100 jours, avec des femelles adultes soumises à un régime mixte ordinaire. Les femelles sont fécondées et donnent naissance à des portées, normales par le nombre et la taille des petits. L'appareil génital mâle n'est donc nullement affecté par les carences, soit en lysine, soit en cystine ; tout au plus observe-t-on un léger retard (15 à 20 jours environ) dans l'établissement de la spermatogénèse.

Chez le Rat femelle carencé en cystine, l'effet de la carence dépend de l'âge du sujet.

A. — L'adulte n'est nullement affecté et le cycle oestrien persiste encore après 70 jours de carence. La femelle peut être fécondée et poursuivre la gestation jusqu'à terme.

B. — Chez la femelle impubère, la carence en cystine, selon les individus, inhibe ou n'inhibe pas l'instauration du cycle ovarien.

Sur 21 jeunes femelles, pesant environ 40 g. et soumises à la carence en cystine à l'âge de 40 jours, 13 ne présentaient aucune desquamation vaginale après 90 jours de carence ; à l'autopsie, nous avons trouvé l'ovaire immature, sans corps

jaunes, avec de petits follicules non développés. Dans les 8 autres cas, nous pûmes observer une kératinisation périodique de l'épithélium vaginal, suivie de desquamation et nous trouvâmes à l'autopsie des ovaires mûrs avec de gros follicules et plusieurs corps jaunes.

L'existence de ces cas positifs nous a amenés à penser qu'une très faible quantité de cystine doit être nécessaire pour obtenir la maturation de l'ovaire et que, selon les individus observés, nous nous trouvions tantôt un peu en dessous (cas négatifs), tantôt un peu au dessus (cas positifs) du seuil de cystine nécessaire.

La carence que nous avons réalisée à l'aide de la phaséoline est très sévère : aussi avons nous lieu de penser que le seuil de cystine nécessaire à la maturation sexuelle de la femelle doit être très bas.

De ces faits nous pouvons rapprocher les résultats d'essais antérieurs entrepris sur la Souris dans des conditions un peu différentes (carence en cystine moins stricte réalisée au moyen de la caséine, employée au taux de 6 p. 100 de la ration). Cette carence presque totale n'empêche nullement la maturation sexuelle et la reproduction des souris.

12 couples impubères, pesant en moyenne $8 \text{ g. } 23 \pm 0,17$, carencés durant 130 jours, crûrent cependant, avec une extrême lenteur, et atteignirent $14 \text{ g. } 31 \pm 0,83$ en 98 jours. Parvenus à maturité, les animaux s'accouplèrent et donnèrent parfois des rejetons.

J'ai pu observer ainsi jusqu'à 8 portées, dont 4 composées de petits vivants : ceux-ci étaient de forme normale, mais de taille très réduite (0 g.,45 environ, alors que le poids moyen d'un souriceau nouveau-né est de 1 g.,4 à 1 g.,5) et très peu nombreux (un ou deux par portée). Ils étaient d'ailleurs viables et 3 d'entre eux, allaités par des femelles en régime mixte ordinaire, rattrapèrent bientôt la taille normale.

Donc, malgré une carence presque complète, la maturation sexuelle s'effectue normalement chez la Souris : chez cette espèce le seuil de cystine doit être extrêmement bas, et nous avons tout lieu de penser qu'il doit en être de même pour le Rat.

La carence en lysine a des effets qu'il est plus difficile d'interpréter : Selon COURRIER et RAYNAUD [18], on ne constate pas l'apparition de l'oestrus chez le jeune Rat femelle carencé en lysine ; ces auteurs font apparaître l'oestrus par implan-

tation d'hypophyse. PEARSON [56] a complété récemment ces observations par l'étude d'animaux plus âgés : l'oestrus disparaît au bout de quelque temps chez la femelle adulte, sous l'effet de la carence ; il réapparaît, si l'on ajoute de la lysine au régime. Nous avons vérifié, toujours par la technique des frottis vaginaux, les observations des auteurs précédents : absence de cellules kératinisées chez la jeune femelle de 70 à 80 grammes, carencée en lysine, disparition du cycle vaginal chez l'adulte ; mais nos résultats sont beaucoup plus irréguliers que ceux de PEARSON et la variabilité individuelle bien plus grande : chez certains individus, nous avons pu observer jusqu'à 8 oestrus successifs après le début de la carence, à intervalles réguliers de 4 à 5 jours, avec kératinisation typique de la paroi vaginale, avant d'aboutir à l'état de repos vaginal signalé par PEARSON. Nous avons pu faire reparaître très rapidement le cycle vaginal chez ces femelles adultes carencées, soit par ingestion, soit par injection intrapéritonéale de bichlorhydrate de lysine, exactement neutralisé par du bicarbonate de sodium. Pour les injections, le bichlorhydrate de lysine était mis en solution dans du liquide de Tyrode frais. Les injections doivent être fréquentes (4 à 6 par jour, avec une dose journalière totale de 0 g., 12), le rendement étant évidemment moins bon que dans le cas de l'ingestion, où la lysine est continûment absorbée à petite dose. Néanmoins, la possibilité de suppléer l'animal par voie parentérale montre que la lysine intervient directement, sans qu'elle doive au préalable subir la digestion.

L'autopsie des animaux carencés nous a amenés à une constatation assez inattendue : soit que le cycle vaginal ne se soit pas établi, soit qu'il ait disparu, on s'attendrait à trouver l'ovaire à l'état de repos : il n'en est rien et nous avons trouvé de gros follicules mûrs, contenant un ovule déhiscent, d'autres déjà vidés de leurs ovules, et de nombreux corps jaunes ovoprives, cela même après 130 jours de carence. Le cycle ovarien (maturation folliculaire, ponte ovulaire et lutéinisation) se déroule donc normalement, sans que l'on puisse en observer les répercussions cycliques sur la muqueuse vaginale ; l'examen histologique du vagin montre l'assise muqueuse externe recouvrant les cellules basales, mais il n'y a pas desquamation de l'épithélium vaginal et l'on n'observe pas de grandes cellules kératinisées. Une telle dissociation du cycle ovarien et du cycle vaginal est assez rare : BUSCHKE et

ZONDEK [10] ont signalé un phénomène semblable dans le cas de l'intoxication expérimentale par les sels de thallium, mais il s'agit sans doute ici d'un tout autre mécanisme.

On se rappelle que COURRIER et RAYNAUD ont pu obtenir le cycle vaginal typique en implantant chaque jour sous l'abdomen de la jeune femelle carencée, une hypophyse entière de jeune rat mâle. On pourrait donc penser qu'il y a, chez la femelle carencée, production insuffisante de gonadostimuline A par le lobe antérieur de l'hypophyse : on observe cependant la maturation folliculaire, ce qui implique l'émission d'une certaine quantité de gonadostimuline par l'hypophyse ; on pourrait alors supposer qu'il en faut une dose plus forte (fournie expérimentalement par l'implant quotidien) pour provoquer la libération de la quantité de folliculine nécessaire à la kératinisation du vagin.

A défaut des gonadostimulines antéhypophysaires, alors introuvables dans le commerce, nous avons essayé sur des femelles carencées d'âges divers, les prolans urinaires, dont l'action est fort analogue. A 8 jeunes rates impubères, âgées de 40 jours et carencées depuis le 25^e jour, nous avons injecté chaque jour, durant 7 jours, à chacune 7 U.R. d' « Antélobine » de BYLA (extrait injectable des prolans totaux de l'urine de femme gravide). D'autre part, nous avons traité des rates adultes, chez qui la carence avait fait disparaître le cycle vaginal depuis 60 jours, par un extrait, contenant principalement du prolan A, agissant surtout sur la maturation folliculaire et la libération de la folliculine dans l'organisme (1).

Chez l'animal impubère, on assiste à la maturation des follicules et à la formation de nombreux corps jaunes ; le vagin et l'utérus sont hypertrophiés ; finalement, le vagin s'ouvre et la desquamation de l'épithélium vaginal se produit. Les mêmes phénomènes (à part l'ouverture, déjà existante, du vagin) s'observent chez l'adulte. Dans les deux cas, il y a un contraste frappant entre l'ampleur des remaniements internes (hypertrophie ovarienne et utérine, lutéinisation générale) et le caractère extrêmement tardif de la desquamation vaginale. Ce n'est qu'après 5 jours de traitement ayant déjà

(1) Pour préparer cet extrait, j'ai traité 1 volume d'urine de femme ménopausée, par 4 volumes d'alcool à 95° ; le précipité, centrifugé, a été dissous de nouveau dans l'eau distillée, puis soumis encore une fois à la précipitation alcoolique et à la centrifugation, et dissous enfin dans un volume d'eau physiologique tel que 1 cm³ d'extrait correspondit à 40 cm³ d'urine initiale ; l'injection intrapéritonéale fut pratiquée à la dose quotidienne de 1 cm³.

fourni 35 U.R. de prolans A et B, que les cellules kératinisées apparaissent dans le contenu vaginal des impubères, et, chez la femelle adulte, carencée depuis longtemps, il a fallu 10 à 12 jours de traitement, représentant au moins la valeur de 400 cm³ d'urine initiale, pour obtenir la desquamation de l'épithélium vaginal. Dans la carence en lysine, la muqueuse vaginale semble être la partie de l'appareil génital la plus lente à réagir à l'action des prolans, ne répondant d'ailleurs qu'à l'accumulation de doses massives ; c'est à de telles doses que devait correspondre l'implantation quotidienne d'une hypophyse entière, pratiquée par COURRIER et RAYNAUD [18].

Il se peut qu'il y ait seulement élévation, par suite de la carence, du seuil de réaction de la muqueuse vaginale à la folliculine ; dans ce cas l'équilibre hormonal des animaux carencés ne serait pas troublé ; on aurait seulement un changement dans les propriétés de l'épithélium vaginal, que la carence met peut-être dans un état de sous-nutrition particulièrement accusé. Pour nous en assurer, nous avons pratiqué l'ablation des deux ovaires sur de jeunes Rates impubères et nous les avons ensuite carencées en lysine ; après 30 jours de carence, nous avons injecté à la moitié du lot, une solution huileuse de folliculine (à 2 mg. par litre) dont 1 cm³ contenait 20 U.I. ; là encore, nous avons provoqué une rapide hypertrophie de l'utérus (celui-ci pèse 111 mg., $4 \pm 8,7$ chez les animaux traités, 14 mg., $5 \pm 1,8$ chez les témoins ovariectomisés). Par contre nous n'avons pu obtenir la desquamation vaginale qu'après un assez long temps de latence et avec des doses élevées (au moins 5 U.I. quotidiennes pendant 5 jours, dans le cas le plus favorable). La sensibilité de l'épithélium vaginal à la folliculine, paraît donc nettement diminuée dans la carence en lysine, et c'est là qu'il faudrait voir l'explication des résultats de nos prédécesseurs et de nos propres observations. Mis à part ce singulier phénomène, l'accomplissement des fonctions génitales essentielles ne paraît pas troublé chez le Rat femelle carencé en lysine.

Comme nous l'avons signalé, chez l'animal impubère, la carence en lysine laisse intacte la capacité de réaction des glandes génitales aux injections de prolans et de folliculine ; nous avons observé des phénomènes identiques, en ce qui concerne les prolans, dans la carence en cystine. On peut, par l'injection de prolans, provoquer chez l'animal impubère carencé d'importants remaniements, beaucoup plus considérables que

ceux qui se produisent naturellement au cours des carences : le jeune animal conservant le même poids global, le développement provoqué de l'appareil génital s'accomplit donc aux dépens des organes somatiques ; l'étude quantitative de ces phénomènes sera faite à la fin du chapitre suivant. Signalons seulement ici que, par cette technique, on peut obtenir des animaux sexuellement adultes (tout au moins pour les femelles) et pouvant être longtemps maintenus à une taille naine (20 à 25 grammes) ; chez le mâle, les injections de prolans n'amènent qu'une hypertrophie du testicule et des annexes génitales (épididyme, canal déférent), sans spermatogénèse. On pourrait essayer d'accoupler ces femelles carencées, naines et sexuellement adultes, avec des mâles normaux, et en cas d'échec, recourir à l'insémination artificielle ; on comparerait alors la croissance intra-utérine réalisée ainsi chez un animal nain, à celle que l'on peut suivre chez des femelles normales pesant dix fois plus. Je ne sais si cette expérience, que nous n'avons pas eu le temps d'effectuer, se montrera réalisable, elle mériterait en tout cas d'être tentée.

L'étude des fonctions de reproduction chez les animaux carencés en lysine ou en cystine aboutit à la conclusion suivante : mise à part la sensibilité de l'épithélium vaginal à la carence en lysine, le germen est, dans l'ensemble, relativement indifférent aux deux carences.

Les mécanismes fonctionnels liés à l'âge (involution thyroïdienne, ossification, instauration de la vie sexuelle et de sa périodicité rythmique) se déroulent normalement chez les animaux carencés et marquent les étapes du vieillissement de l'animal.

Le mécanisme de la mitose ne paraît pas non plus troublé : on sait que les mitoses somatiques de remplacement (épithéliums cutanés et digestifs) s'effectuent normalement chez les animaux carencés ; il en est de même des divisions germinales, par exemple dans le testicule ; les animaux carencés sont également capables de mitose, en ce qui concerne les tissus de soutien, dans le cas de la régénération d'une région lésée : nous avons pu observer à loisir ce phénomène chez les jeunes femelles ovariectomisées et carencées aussitôt en lysine. La cicatrisation des incisions dorsales par où a été effectuée l'ablation des ovaires, s'opère très normalement en une dizaine de jours ; l'examen ultérieur, tant histologique qu'anatomique, de la région lésée, fait voir une parfaite restauration

de l'épiderme et du derme, du conjonctif sous-cutané et du panicule adipeux, ainsi que de la tunique péritonéale, ce qui implique de nombreuses mitoses conjonctives et musculaires ; ces phénomènes de régénération et de cicatrisation provoquées, chez les animaux privés de lysine ou de cystine, mériteraient, à eux seuls, une étude spéciale. Outre ces mitoses de régénération, les tissus de soutien peuvent présenter aussi des mitoses de croissance : nous allons voir que, par un traitement hormonal approprié, les animaux carencés peuvent être le siège de croissances locales importantes, qui impliquent vraisemblablement des mitoses conjonctives et musculaires.

Tout au long de cette étude, aucun mécanisme essentiel ne nous a paru affecté par les carences en lysine et en cystine : ces acides aminés, lorsqu'ils ne se trouvent pas dans l'alimentation, doivent être transportés d'un organe à l'autre, et les mécanismes fonctionnels sont assurés coûte que coûte ; la lysine et la cystine paraissent jouer surtout le rôle passif de matériaux de construction. Les résultats du chapitre suivant confirmeront cette impression.

CHAPITRE III.

MODIFICATIONS EXPÉRIMENTALES PRODUITES PAR L'ACTION DE DIVERSES HORMONES CHEZ LES ANIMAUX CARENCÉS.

Il a été fait état, au cours du chapitre précédent, de travaux récents sur le tryptophane (BERG et ROSE, [7], ALCOCK [3]), qui nous montrent en cet acide aminé plutôt un régulateur externe de quelque mécanisme humoral qu'un appoint matériel exigé par l'usure des tissus. En discutant les diverses explications possibles des croissances partielles que masque un équilibre global apparent, chez les animaux carencés en lysine ou en cystine, j'ai indiqué que l'on pouvait songer pour ces acides aminés à un rôle régulateur, mais concernant cette fois la croissance, et non plus l'entretien.

Les principales glandes endocrines directement liées au développement sont le lobe antérieur de l'hypophyse et la thyroïde ; leur ablation entraîne l'arrêt de la croissance ; la greffe ou, à défaut, l'injection répétée d'extraits glandulaires, en provoque la reprise. On peut se demander si l'arrêt de croissance des animaux carencés ne correspondrait pas à quelque perturbation dans la production ou l'émission des hormones agissant sur la croissance (hormone somatotrope antéhypophysaire et hormone thyroïdienne). Ce problème est à l'origine des recherches dont l'exposé constitue le présent chapitre ; le principe de ces recherches est simple : j'ai étudié, sur des rats carencés, soit en lysine, soit en cystine, les effets de l'injection répétée, soit d'extraits antéhypophysaires, soit de thyroxine. J'ai préféré cette technique des injections d'extraits à celle, plus biologique, de la greffe, car, seule, elle me permettait d'opérer sur un assez grand nombre d'animaux pour obtenir des résultats statistiques. Elle a aussi l'avantage d'une plus grande précision : la thyroxine, bien que moins active que la glande dont elle est extraite, a les mêmes propriétés qualitatives, et peut être administrée en quantités exactement dosées. Quant aux extraits antéhypophysaires,

simples mélanges de polypeptides complexes et mal définis, il font l'objet d'un dosage biologique. Leur emploi, s'il est soumis à un choix judicieux, permet d'éliminer, parmi les nombreux principes sécrétés par le lobe antérieur, ceux dont l'action pourrait masquer ou contrarier les effets de l'hormone somatotrope.

Bien que la réponse à la question que je m'étais posée ait été finalement négative, cette tentative méritait d'être faite : elle constitue un premier essai d'étude systématique de l'interaction de deux phénomènes agissant en sens contraire : la déficience azotée, qui provoque l'arrêt de la croissance, et l'impulsion hormonale, ici artificiellement accrue, qui en stimule l'accomplissement et en assure la régulation chez l'animal normal. Comme nous aurons l'occasion de le voir, l'arrêt de croissance provoqué par la privation de lysine ou de cystine persiste, quel qu'ait été le traitement hormonal. Est-ce à dire que les tissus des animaux carencés aient perdu leur capacité de réagir aux hormones de croissance ? Il n'en est rien : l'action de ces hormones se fait sentir de préférence sur certains organes ou tissus, les mêmes chez l'animal carencé que chez l'animal normal ; mais, chez l'animal carencé, la masse globale ne peut s'accroître, et l'organisme est le siège d'importants transferts, les organes dont la croissance est particulièrement stimulée par l'hormone injectée, s'accroissant au détriment des autres. L'action particulière des hormones antéhypophysaire ou thyroïdienne sur tel ou tel système subsiste donc ; seule est inhibée leur action sur l'accroissement de la masse totale. L'arrêt de croissance a donc une autre cause que le mauvais fonctionnement d'un mécanisme humoral et la lysine et la cystine sont sans doute des matériaux nécessaires à la synthèse de tout nouveau protoplasme. Peut-être même ces acides aminés n'ont-ils pas d'autre rôle dans la croissance ? En tout cas, les seuls mécanismes humoraux que nous sachions actuellement présider à la croissance ne nous apparaîtront guère en relation avec les carences en lysine et en cystine.

1) L'hormone somatotrope de l'hypophyse antérieure.

Depuis les premiers travaux de Pierre MARIE sur le gigantisme hypophysaire et l'acromégalie, de nombreux travaux, tant physiologiques que cliniques, ont été consacrés à l'action

du lobe antérieur sur la croissance. Je laisserai de côté les multiples expériences d'hypophysectomie et, sans prétendre évidemment les passer tous en revue, je signalerai seulement les principaux travaux qui ont trait à l'action des extraits antéhypophysaires sur la croissance. EVANS et LONG [23, 24], les premiers, injectèrent chaque jour, durant plusieurs mois, à de jeunes rats femelles, une suspension fraîche de lobe antérieur d'hypophyse de Bœuf ; ils obtinrent ainsi une prolongation de la croissance, aboutissant à des géants, deux fois plus lourds que les témoins : les proportions relatives des organes paraissaient conservées, sauf pour la rate, particulièrement grossie. Les recherches ultérieures de WADEHN [68] confirmèrent, par l'analyse chimique de semblables géants, qu'il s'agissait bien d'une croissance véritable et non d'une hydratation des tissus ou d'une surcharge graisseuse. EVANS et LONG, dans leur premier travail, avaient observé, chez les animaux traités, une irrégularité, puis un arrêt de l'oestrus. Pour se débarrasser des principes gonadotropes, EVANS et SIMPSON [25] employèrent, au lieu d'une simple suspension de lobe antérieur, broyé dans de l'eau physiologique, un extrait alcalin, déféqué ensuite par neutralisation presque complète à l'acide acétique : ils n'observèrent plus d'effet sur l'oestrus, mais, par contre, ils purent obtenir une reprise de la croissance chez des animaux adultes en équilibre. Fait inattendu, les femelles se montrèrent beaucoup plus sensibles que les mâles à l'action de l'hormone ; l'ablation des gonades, de l'un ou de l'autre sexe, ne fit pas disparaître cette différence, qui doit être un caractère sexuel primaire. (Aussi ai-je pris soin d'opérer uniquement sur des femelles, pour toutes mes expériences sur l'hormone de croissance hypophysaire). Sur la nature de cette croissance provoquée, et son mécanisme, nous ne savons que peu de chose : elle correspond évidemment à une rétention azotée, comme l'a constaté GAEBLER [28] sur le Chien, et s'accompagne d'une rétention d'eau, également passagère ; à la rétention d'azote par le rein, correspond un appel d'azote par les tissus, que traduit une baisse de 20 à 30 p. 100 dans le taux de l'azote non-protidique du sang (TEEL et WATKINS [64]). LEE et SCHAFER [44], opérant sur de jeunes Rats en croissance, observent une accélération de la croissance, et une amélioration dans le rendement de la synthèse protéique ; les animaux traités sont moins riches en graisses, mais plus riches en eau et en azote que les témoins de même

portée. L'accélération de la croissance porte sur l'élaboration du protoplasme, plus rapide que celle des réserves. Par ailleurs, ALCOCK [3] a constaté que la carence en tryptophane n'empêchait pas, chez le Rat, l'action de l'hormone somatotrope, se traduisant par un gain de poids temporaire.

L'acromégalie, résultat fréquent des injections répétées d'hormone somatotrope, est classiquement considérée comme le « gigantisme de l'adulte » ; en fait, elle est surtout le propre des espèces dont les cartilages épiphysaires se soudent tôt : c'est le cas de l'Homme, et l'on connaît en clinique de nombreux cas d'acromégalie, dûe à des tumeurs du lobe antérieur. PUTNAM, BENEDICT et TEEL ont réussi à la provoquer aussi chez le Chien, par des injections massives et répétées d'extrait somatotrope. EVANS [21] a reproduit récemment leurs expériences et retrouvé leurs résultats, mais il a été beaucoup moins heureux avec les espèces (Rat, Lapin) chez qui la soudure des cartilages épiphysaires est tardive. Acromégalie et Gigantisme sont donc deux effets d'une même cause, l'apparition de l'un ou de l'autre dépendant à la fois de l'âge de l'animal et de l'espèce étudiée.

a) LA CARENCE EN LYSINE.

Une première série d'expériences a trait à des animaux d'âge moyen (65 jours). Ces femelles reçurent chaque jour, en injection intrapéritonéale, un extrait alcalin de lobe antérieur, préparé selon la technique suivante, due à EVANS et SIMPSON [25] : 15 g. de lobes antérieurs de Bœuf, fraîchement prélevés (1), furent pilés au mortier, avec 7 g.,5 de sable fin, jusqu'à former une pâte homogène ; celle-ci fut pesée et j'ajoutai de l'eau distillée à raison de 2 cm³ pour 1 g. de pâte ; je mesurai alors le volume total du mélange et j'ajoutai une solution de soude caustique de titre 0,2 N., à raison de 3/8^e du volume précédent. Puis, après avoir laissé le tout durant 6 heures à la glacière, je le centrifugeai 15 minutes à la vitesse de 2.000 tours/minute. L'extrait alcalin trouble, décanté, fut ensuite neutralisé par de l'acide acétique, de titre N/5, versé goutte à goutte en agitant constamment. Cette neutralisation fut accompagnée de nombreux essais au rouge de phénol (examen d'une goutte d'extrait en solution dans 5 cm³

(1) Je dois à la complaisance des Etablissements BYLA d'avoir pu me procurer directement, à l'abatage, les glandes dont j'avais besoin.

d'eau distillée neutre, en présence d'une goutte de réactif) ; je versai un léger excès d'acide jusqu'à ce que l'addition d'une seule goutte d'acide donnât une coloration jaune à l'extrait (en présence de rouge de phénol) ; puis j'alcalinisai de nouveau, avec de la soude de titre N/5, jusqu'à ce que l'extrait présentât le plus léger virage au rose, en présence du rouge de phénol. Le mélange fut alors centrifugé 40 minutes, à la vitesse de 2.000 tours/minute, pour éliminer les protéines précipitées par la neutralisation, et le liquide clair surnageant, légèrement opalescent, fut conservé à la glacière, pour être employé tel quel, sans stérilisation, l'hormone de croissance étant thermolabile. Pour éviter toute altération, les extraits furent faits à nouveau, tous les 7 jours, avec des lobes frais. Je les essayai, tout d'abord, sur des femelles adultes, recevant un régime normal (pain, grains et salade) ; 6 d'entre elles, pesant en moyenne 224 g.,8, demeurèrent en palier durant 26 jours, avec un poids final moyen de 221 g.,7. Les estimant en équilibre, je les soumis, durant 15 jours, à l'injection intrapéritonéale quotidienne de 0 cm³,5 d'extrait ; elles accusèrent un gain de poids important, passant à une moyenne de 261 g.,8. L'extrait s'étant montré efficace, je pus commencer le traitement sur les animaux carencés, en employant la même dose quotidienne, dose double du minimum quotidien (0,25 cm³) indiqué par EVANS et SIMPSON [25] pour un extrait identique.

Des femelles âgées de 65 jours, furent soumises, durant 105 jours, au régime à base de gliadine précédemment décrit (cf. p. 27). Tous les animaux, traités et témoins, furent soumis à la carence. Celle-ci, on l'a vu au chapitre II, entraîne des modifications dans les proportions relatives des organes ; il importait que seules apparussent les différences dues au traitement hormonal. Celui-ci fut pratiqué quotidiennement, à partir du 16^e jour de carence, et durant 90 jours, sur 14 femelles, qui demeurèrent en palier, passant seulement de 90 g.,3 $\pm$ 1,9 à 95 g.,8 $\pm$ 3,2. Les 10 femelles témoins, dans le même temps, demeurèrent à poids constant, de 89 g.,7 $\pm$ 1,7 à 90 g.,8 $\pm$ 2,2. L'action caractéristique de l'hormone somatotrope sur l'accroissement du poids total ne peut donc être obtenue chez l'animal carencé en lysine, à l'inverse de ce qui se passe dans la carence en tryptophane (ALCOCK). Par contre, on observe d'importants changements dans les proportions relatives : on les trouvera réunis au tableau VIII.

TABLEAU VIII.

Action de l'extrait alcalin d'antéhypophyse sur des Rates carencées en lysine.
(poids des organes en mg.)

Organes	Animaux traités			Témoins			Nature de la différence entre les animaux carencés et les témoins
	Poids frais	Poids sec	Teneur substance sèche en p. 100	Poids frais	Poids sec	Teneur substance sèche en p. 100	
Foie.....	6700,6 ± 231	1661,7 ± 56,2	24,8	5498 ± 204,8	1358 ± 51,4	24,7	+
Poumons.....	960,3 ± 42	198 ± 7,4	20,6	949,9 ± 41,7	170,9 ± 6,9	18	NS.
Rate.....	616,2 ± 26,8	132 ± 6,1	21,4	486,4 ± 21,1	97,2 ± 4,9	20	+
Surrénales.....	35,9 ± 1,8			27,3 ± 1,3			+
Cœur.....	566,6 ± 49,1	123,5 ± 3,8	21,8	464,3 ± 15,9	98,9 ± 3,3	21,3	+
Reins.....	1391 ± 65	260,1 ± 13,1	18,7	1400 ± 66,1	242,2 ± 12	17,3	NS.
Yeux.....	267 ± 7	58,5 ± 1,5	21,9	232 ± 6,6	50,3 ± 1,4	21,7	+
Hypophyse.....	4,1 ± 0,3			6 ± 0,4			-
Gl. salivaires.....	394,5 ± 29,7	73,8 ± 7,9	18,7	390 ± 30,6	74,8 ± 7,4	18,4	NS.
Tract. génit.....	121 ± 9,1			206 ± 12,7			-
Encéphale.....	1610,3 ± 71,1	333,2 ± 13,5	20,7	1385,2 ± 65,4	328,1 ± 14	20,7	NS.
Tube digestif.....	5427 ± 238	1058,2 ± 45,7	19,5	5472,2 ± 256,5	995,9 ± 40,6	18,8	NS.
Pieds.....	1731,5 ± 50,1	734,1 ± 23,6	42,4	1515 ± 44,2	574,2 ± 20,2	37,9	+
Long. pieds.....	36 mm.,4 ± 0,8			32 mm.,5 ± 0,8			+
Mains.....	561,5 ± 19,5	225,2 ± 8,7	40,4	478,5 ± 15,1	173,2 ± 8,1	36,2	+

S + : Accroissement significatif. S - : Diminution significative.
NS. : Différence non significative.

On retrouve ici la splénomégalie, signalée par EVANS et LONG, dans leurs premiers travaux : la rate, déjà grossie par la carence en lysine (cf. tableau I), est hypertrophiée chez les animaux traités et pèse 22 p. 100 de plus que chez les témoins. Le foie, le cœur, les yeux, les glandes surrénales, ont également leur croissance stimulée par le traitement hormonal, l'hypertrophie des surrénales paraissant localisée histologiquement à la zone corticale. L'hypophyse est au contraire réduite chez les animaux traités, phénomène dû sans doute à la continuelle surcharge d'hormones hypophysaires que constitue ce traitement prolongé ; l'examen histologique de l'hypophyse, dans les deux groupes, ne m'a pas révélé de différences notables dans l'aspect et la répartition des divers éléments (éosinophiles, basophiles, chromophobes). Le tractus génital (ainsi délimité : ovaires, trompes et utérus jusqu'au col) subit aussi une réduction très nette chez les animaux traités : ce peut être, soit un effet secondaire de la réduction de l'hypophyse, soit un effet direct de l'hormone somatotrope, dont l'action est souvent antagoniste de celle des principes gonadotropes. J'ai déterminé aussi, avec une moindre précision, les poids des pieds et des mains, mais il est assez difficile d'en délimiter toujours semblablement l'extrémité proximale ; on observe une différence, plus nette si l'on compare les poids secs, mais toujours significative, en faveur des animaux traités, dont les extrémités sont plus développées que celles des témoins ; la considération des chiffres individuels renforce cette conclusion : l'acromégalie, d'ailleurs restreinte aux membres, m'est apparue comme un phénomène sporadique, particulièrement net chez quelques individus, sans doute plus sensibles au traitement hormonal ; je donnerai ici quelques chiffres caractéristiques : n° 5, pieds (poids frais) 1.963 mg., poids sec 824 mg. ; n° 7 pieds (poids frais) 1.894 mg., poids sec 796 mg. ; n° 11, pieds (poids frais) 1.839 mg., poids sec 771 mg.. J'ai signalé précédemment que le traitement hypophysaire provoquait généralement, chez le Rat, le gigantisme et non l'acromégalie. Mais, dans le cas présent, la déficience azotée fait obstacle à la croissance ; d'ailleurs l'acromégalie est légère et la variabilité individuelle assez forte.

Je mentionnerai également un fait singulier : en contraste avec les résultats de LEE et SCHAFER [44] sur le jeune Rat normal en croissance, la teneur en eau de nombreux organes (poumons, rate, reins, membres) paraît ici systématiquement

abaissée par les injections d'hormone somatotrope : il s'agit, il est vrai, dans le cas présent, d'un traitement beaucoup plus prolongé, portant sur des animaux plus âgés, et nous ne retrouverons pas ce phénomène dans les expériences de moins longue durée, exécutées sur de jeunes animaux. Peut-être certains organes, que le maintien en équilibre de l'ossature empêche de s'accroître en volume, finissent-ils par augmenter leur poids sec, dans les limites compatibles avec le fonctionnement.

L'expérience précédente, conduite avec un extrait hypophysaire brut, n'est pas exempte de critique : l'hypertrophie des surrénales, localisée à la zone corticale, pourrait faire penser à une action de l'hormone adrénotrope, l'hypertrophie du cœur à une action secondaire de la thyroïde, stimulée par l'hormone thyrotrope du lobe antérieur. Aussi ai-je jugé préférable de répéter cette expérience avec des préparations de lobe antérieur plus purifiées que le simple extrait alcalin d'EVANS et SIMPSON [25]. Certains auteurs (RIDDLE en particulier) font à l'usage des extraits purifiés une objection préalable : selon eux, il n'existerait pas d'hormone de croissance individualisée, et l'effet des injections d'extraits sur la croissance ne serait qu'une résultante de l'action des diverses glandes endocrines (thyroïde, surrénales, gonades) stimulées par l'hypophyse ; cet effet sur la croissance irait en s'affaiblissant à mesure que l'on tenterait de purifier les extraits, pour isoler la prétendue hormone de croissance. Les travaux récents ne permettent pas de retenir cette conception de RIDDLE et l'hormone de croissance hypophysaire semble bien être un composé distinct. Malheureusement les hormones du lobe antérieur ne sont pas faciles à séparer : ce sont des polypeptides complexes, généralement thermolabiles, et très aisément adsorbés par les précipités protéiques ; COLLIP et ses collaborateurs [15] ont récemment mis au point une technique délicate de préparation à froid, par précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse. J'ai pu me procurer dans le commerce, sous le nom d' « Antuitrin Growth » (1) une préparation purifiée d'hormone somatotrope, obtenue par élimination successive de divers protides, dont chacun est précipité à son point iso-électrique. Ce produit, pratiquement exempt de principes go-

(1) Je tiens à remercier les Etablissements PARKE et DAVIS, qui m'ont fourni gracieusement la moitié de l'« Antuitrine » que j'avais commandée.

TABLEAU IX.

Action de l'hormone somatotrope sur de jeunes Rates (âgées de 37 jours) et carencées en lysine durant 47 jours (poids des organes en mg.)

10 animaux traités. Passent de 38,2 $\pm$ 1,7 à 44,9 $\pm$ 1,4				9 témoins Passent de 38,7 $\pm$ 1,9 à 40,3 $\pm$ 2,8			Nature de la différence entre les animaux carencés et les témoins
Organes	Poids frais	Poids sec	Teneur substance sèche en p. 100	Poids frais	Poids sec	Teneur substance sèche en p. 100	
Foie.....	3721,8 $\pm$ 130,7	878,3 $\pm$ 18,4	23,6	3084,5 $\pm$ 112,4	731 $\pm$ 14,2	23,7	S +
Rate.....	221,9 $\pm$ 9,1	43,7 $\pm$ 2	19,7	171,3 $\pm$ 6,9	33,4 $\pm$ 4,6	19,5	S +
Cœur.....	308,2 $\pm$ 9,8	64,4 $\pm$ 2,3	20,8	294,3 $\pm$ 8,6	62,1 $\pm$ 1,8	21,1	NS.
Reins.....	719,8 $\pm$ 21,5	117,3 $\pm$ 3,5	16,3	717,5 $\pm$ 20,3	118,4 $\pm$ 3,9	16,5	NS.
Hypophyse....	1,8 $\pm$ 0,16			2,8 $\pm$ 0,25			S -
Surrénates....	17,1 $\pm$ 0,7			13,2 $\pm$ 0,6			S +
Yeux.....	179,9 $\pm$ 4,8	27,3 $\pm$ 0,7	15,2	154,3 $\pm$ 4,2	23,9 $\pm$ 0,7	15,4	S +
Pieds.....	1193,4 $\pm$ 38	465,4 $\pm$ 14,8	39	1031 $\pm$ 33	391,8 $\pm$ 13,3	38	S +
Mains.....	446,9 $\pm$ 12,9	160,9 $\pm$ 4,7	36	388,7 $\pm$ 11,1	139,6 $\pm$ 4,1	35,9	S +
Tract. génit....	28,7 $\pm$ 1,2			41,3 $\pm$ 1,9			S -
S + : Accroissement significatif.				S - : Diminution significative.			NS. : Différence non significative.

nadotropes, thyroïdrotrope, et adrénotropes, est dosé biologiquement sur des Rats femelles adultes en équilibre, chez qui il provoque une reprise de la croissance. Chaque cm³ d'extrait contient 10 U. R. (l'U. R. étant la dose quotidienne minima qui provoque un accroissement journalier de 1 p. 100 du poids total, l'essai étant poursuivi 10 jours au moins). J'ai donc adopté l'« Antuitrine » à la dose quotidienne de 2 U. R., en injections intrapéritonéales ; mes essais diffèrent de ceux qui viennent d'être relatés, par leur moins longue durée et l'emploi d'animaux plus jeunes. Le tableau IX donne les résultats pour la carence en lysine.

L'« Antuitrine », comme l'extrait alcalin brut, provoque l'hypertrophie de la rate, du foie, des yeux et des glandes surrénales ainsi qu'une légère acromégalie, et, par contre, une réduction de l'hypophyse et du tractus génital ; le cœur, cette fois, n'est pas hypertrophié : dans l'expérience précédente, son accroissement devait être stimulé par la thyroïde, elle-même stimulée par l'hormone thyroïdrotrope, qui est présente en quantité notable dans l'extrait alcalin brut.

b) LA CARENCE EN CYSTINE.

Elle a été réalisée en soumettant les animaux au régime à base de farine de Haricot, décrit au chapitre II (p. 37). La conduite et les résultats de cette expérience, consignés au tableau X, sont de même nature que dans la carence en lysine.

La comparaison des tableaux VIII, IX et X fait voir que l'action de l'hormone somatotrope est, dans une assez large mesure, indépendante de l'âge des animaux et de la nature de la carence ; l'une et l'autre carences inhibent la synthèse protéique, mais, dans les deux cas, l'action de l'hormone se porte électivement sur certains organes (rate, surrénales, yeux, foie), dont la croissance est stimulée, tandis que d'autres (hypophyse elle-même, tractus génital) subissent une régression. Les reins, les poumons, l'encéphale, demeurent indifférents au traitement. Dans tous les cas, on observe une légère acromégalie, se traduisant par un accroissement de poids et un épaississement des extrémités des membres, cependant que la face demeure normale. Les tissus des animaux carencés réagissent donc à l'hormone somatotrope. Y a-t-il quelque raison de penser que la production de celle-ci pourrait être inhibée ou tout au moins réduite par les carences en lysine et en

cystine ? Il ne semble pas ; les animaux carencés ne présentent pas de retard génital, si fréquent dans le nanisme par déficience hypophysaire ; par ailleurs, les carences laissent à l'hypophyse son aspect histologique normal. Pour être assuré que les carences ne troublent en rien la production de l'hormone somatotrope, on pourrait tenter l'expérience suivante : implanter à de jeunes Rats hypophysectomisés recevant une alimentation mixte ordinaire, des hypophyses prélevées sur des Rats carencés, pour voir si la croissance reprendrait chez les porte-greffe. J'ai reculé d'ailleurs devant la difficulté technique de cette expérience, qui eût exigé un nombreux matériel, vu la réussite toujours problématique de telles implantations. Quoi qu'il en soit, l'ensemble des résultats qui viennent d'être exposés ne plaide guère en faveur d'une relation entre l'arrêt de croissance des animaux carencés et un trouble dans l'action de l'hormone somatotrope antéhypophysaire.

2) La thyroxine.

De nombreuses études ont été consacrées à l'action de l'hormone thyroïdienne sur la différenciation des tissus : sans énumérer les résultats classiques sur le déterminisme de la métamorphose chez les Amphibiens, je rappellerai seulement les recherches déjà anciennes de HOSKINS [34] sur des Rats nouveau-nés : l'injection répétée d'acétyl-thyroxine détermine chez ces animaux une accélération notable de la morphogénèse (poussée du poil, modifications de la forme du squelette, soudure des cartilages épiphysaires). Le rôle de la thyroïde sur la croissance proprement dite a été moins étudié. Sans doute on observe, chez l'animal thyroïdectomisé, un arrêt de la croissance, et une reprise, après la greffe. Mais, pour nombre d'auteurs, il n'y aurait là qu'un aspect des liens étroits qui unissent les sécrétions thyroïdienne et hypophysaire : l'ablation de la thyroïde entraînerait généralement une insuffisance hypophysaire, que guérirait la greffe thyroïdienne. Il semble bien cependant qu'il y ait une action directe de l'hormone thyroïdienne sur la croissance : cette action est d'ailleurs complexe ; le plus souvent il y a une activation de la croissance du squelette, tandis que le poids global diminue à la suite de l'élévation générale du métabolisme (les animaux grandissent et maigrissent en même temps). De plus il faut tenir compte de l'âge des animaux, comme l'ont montré ABDERHALDEN et

WERTHEIMER [1] : tandis que chez le Rat adulte, des doses même modérées de thyroxine entraînent toujours une perte de poids, chez de jeunes Rats de 20 à 50 grammes, on observe un gain de poids notable et une accélération de la croissance sous l'influence de l'hormone. En soumettant au traitement par la thyroxine de jeunes Rats carencés en lysine ou en cystine, je ne m'attendais guère à provoquer une reprise de la croissance : les animaux carencés ne présentent pas les symptômes classiques de l'insuffisance thyroïdienne (myxœdème, rareté du poil, retard de l'ossification) et il eut été assez étonnant qu'un simple traitement à la thyroxine palliât les effets de la déficience alimentaire. Mon intention était plutôt de rechercher si l'on pouvait retrouver sur les animaux carencés les faits très singuliers constatés par CAMERON et ses collaborateurs [11, 12, 13, 14] sur le jeune Rat en croissance recevant, soit des extraits thyroïdiens, soit de la thyroxine pure. Ces auteurs ont observé, au détriment de la musculature, un développement considérable de certains viscères, dont les uns, (poumons, cœur) sont en rapport direct avec la respiration, et les autres (foie, rate, reins) traduisent par leurs dimensions l'activité métabolique générale ; cette déviation de la croissance relative serait due, selon CAMERON, à ce que ces divers organes sont particulièrement stimulés par l'accroissement général des oxydations.

J'ai donc soumis à des injections répétées de thyroxine des Rats maintenus à poids constant, soit par la carence en lysine, soit par la carence en cystine. J'ai employé la dl-thyroxine de HOFFMANN-LA ROCHE ; ce composé est moins actif que l'hormone thyroïdienne véritable, dont la thyroxine forme sans doute le squelette actif ; il présente par contre, sur les préparations de glande thyroïde l'avantage de pouvoir être employé à doses définies. Seuls les sels dipotassique et disodique de la thyroxine étant solubles dans l'eau, il convient d'introduire un excès d'alcali caustique dans la solution ; celle-ci doit être gardée à l'abri de l'air, dont le CO_2 carbonaterait l'alcali ; en effet, en présence d'un carbonate alcalin, seul subsisterait le sel monosodique ou monopotassique de la thyroxine, qui est insoluble et précipiterait.

J'ai fait la solution suivante : Soude caustique pure 5 mg. ; d.l.-thyroxine, 8 mg.,5 ; eau distillée bouillie Q. S. pour 20 cm³ et je l'ai conservée à la glacière et renouvelée tous les 10 jours. Les animaux traités reçurent tous les deux jours, en

TABLEAU XI.
Action de la thyroxine sur de jeunes Rats mâles carencés en lysine.
 (poids d'organes en mg.)

10 animaux traités				9 témoins				Nature de la différence entre les animaux carencés et les témoins
Organes	Poids frais	Poids sec	Teneur substance sèche en p. 100	Poids frais	Poids sec	Teneur substance sèche en p. 100		
Foie.....	4114 ± 124,2	975 ± 26,4	23,7	3521 ± 113,7	838 ± 22,7	23,8	+	
Cœur.....	426,4 ± 14,7	90,6 ± 3,1	21,2	337,2 ± 12,6	72,4 ± 2,7	21,4	+	
Poumons.....	801,5 ± 26,3	145,9 ± 5,2	18,2	543 ± 18,1	104,8 ± 4,1	19,3	+	
Reins.....	999,8 ± 31,1	184,6 ± 6,8	18,4	769,2 ± 24,5	130,7 ± 4,5	17	+	
Rate.....	509,5 ± 21	107 ± 5	20,9	461,5 ± 7,8	32,3 ± 1,9	20	+	
Testicules...	1003,3 ± 41,3	138,5 ± 5,2	43,8	559,8 ± 22	76,1 ± 3,1	43,6	+	
Surénales.....	29,4 ± 1,7			16,1 ± 0,8			+	
Thymus.....	23,5 ± 1,4	4,7 ± 0,4	20	41,7 ± 2,9	8,4 ± 0,7	20	—	
Tibia.....	156,9 ± 6	108,2 ± 4,8	69	131,7 ± 4,5	76,4 ± 3,1	58	+	
Long. tibia....	26 mm.4 ± 0,5			23 mm.3 ± 0,3			+	

S + : Accroissement significatif. S — Diminution significative.

S + : Accroissement significatif. S — Diminution significative.

TABLEAU XII.

Action de la thyroxine sur de jeunes Rats mâles, carencés en cystine
(poids d'organes en mg.)

11 animaux traités				10 témoins				Nature de la différence entre les animaux carencés et les témoins
Passent de $39,2 \pm 1,4$, au 44 ^e jour, à $44,5 \pm 2,1$, au 66 ^e jours.				Passent de $38,7 \pm 1,6$, au 40 ^e jour, à $44,3 \pm 2$, au 66 ^e jour.				
Organes	Poids frais	Poids sec	Teneur substance sèche en p. 100	Poids frais	Poids sec	Teneur substance sèche en p. 100		
Foie.....	3807 $\pm$ 131,7	814,7 $\pm$ 21,5	21,4	3127,9 $\pm$ 106,3	672,5 $\pm$ 17,9	21,5	S +	
Cœur.....	349,8 $\pm$ 12,8	75,2 $\pm$ 3	21,5	267,1 $\pm$ 11,2	57,4 $\pm$ 2,4	21,5	S +	
Poumons.....	694,9 $\pm$ 22,5	129,9 $\pm$ 6,1	18,7	394,6 $\pm$ 15	75,2 $\pm$ 3,5	19,2	S +	
Reins.....	955,3 $\pm$ 30,2	172,9 $\pm$ 7,1	18,1	713 $\pm$ 22,5	121,8 $\pm$ 4,1	17,5	S +	
Rate.....	284,7 $\pm$ 12,9	56,3 $\pm$ 2,4	20	117,5 $\pm$ 6,1	22,1 $\pm$ 1,5	19,7	S +	
Testicules.....	669,2 $\pm$ 19,1	91,7 $\pm$ 3	13,7	557,4 $\pm$ 16,8	76,4 $\pm$ 2,3	13,7	S +	
Surrénales.....	18,2 $\pm$ 1			12,9 $\pm$ 0,5			S +	
Thymus.....	14,7 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 0,3	19,8	44,9 $\pm$ 3,1	8,4 $\pm$ 0,6	20,1	S +	
Tibia.....	146,8 $\pm$ 4,1	95,4 $\pm$ 3,2	65	124,3 $\pm$ 3	69,6 $\pm$ 2,5	56	S +	
Long. tibia....	25 mm., 7 $\pm$ 0,4			23 mm., 1 $\pm$ 0,3			S +	

S + : Accroissement significatif. S — : Diminution significative.

S + : Accroissement significatif.

S — : Diminution significative.

injection hypodermique, 0 cm³,15 de solution, contenant 0 mg.,06 de thyroxine pure, dose assez forte relativement à leur poids. Les tableaux XI et XII contiennent les résultats de ces expériences, respectivement pour la carence en lysine et pour la carence en cystine : on y trouvera, outre les indications concernant les viscères, les poids frais et secs, et la longueur du tibia, ces grandeurs étant prises comme indice de l'ossification et de la croissance du squelette.

Les résultats étant concordants pour les deux carences, je grouperai les conclusions des deux expériences. La thyroxine n'amène pas de reprise de la croissance globale ; on observe, avec une netteté accrue, peut-être due au maintien du poids total, les phénomènes d'hypertrophie viscérale décrits par CAMERON : les viscères s'accroissent très fortement aux dépens du reste de l'organisme, et leur poids relatif, à la fin de l'expérience, est énorme (on remarquera à ce propos que des variations considérables dans les proportions relatives sont compatibles avec l'accomplissement des fonctions physiologiques). Par ailleurs, l'ossification est accélérée et le squelette s'accroît ; à la fin de l'expérience, les animaux traités ont le même poids que les témoins, mais sont à la fois plus grands et plus maigres. L'involution thymique est également accélérée. Dans l'ensemble, les tissus des animaux carencés réagissent à la thyroxine comme ceux des animaux recevant un régime complet.

Nos conclusions seront sensiblement les mêmes que pour le lobe antérieur de l'hypophyse : la carence n'amoindrit pas la réceptivité de l'organisme aux hormones somatotrope de l'hypophyse et thyroïdienne ; elle ne gêne pas l'action de ces hormones, dans la mesure où cette action ne concerne pas l'accroissement de la masse totale. D'autre part, les animaux carencés ne présentent pas les symptômes caractéristiques d'une déficience, soit hypophysaire, soit thyroïdienne. Rien ne permet donc d'affirmer que les carences fassent sentir leur effet par l'intermédiaire de l'une ou de l'autre de ces glandes ; cela semble au contraire peu probable, et l'arrêt de croissance n'est sans doute pas d'origine humorale.

Par ailleurs, les résultats qui viennent d'être exposés constituent une amplification expérimentale des phénomènes de transfert, qui ont été décrits dans la première partie du chapitre précédent.

3) Les prolans.

Je résumerai ici, pour terminer, les résultats numériques, relatifs à la croissance, de mes diverses expériences d'injections de prolans à des rats impubères des deux sexes, carencés en lysine ou en cystine. Entreprises dans une autre intention (cf ch. II. p. 55), elles font apparaître, cette fois au profit du germe, des modifications très analogues à celles que nous venons d'observer pour les organes somatiques. J'ai rassemblé toutes ces données au Tableau XIII.

TABLEAU XIII.

Action des prolans sur la croissance des organes génitaux, dans les deux carences. (Poids d'organes en mg.).

Carence	Durée du traitement	Sexe	Organes poids frais	Animaux traités passent de 28,2 au 29 ^{ej} . à 27,6 au 40 ^e jour	Témoins passent de 27,9 à 28,5 dans le même temps
En lysine	7 U. R. quotidiennes d'« Antelobine » pendant 11 jours	Femelle	ovaires	23 ± 1,9	6,9 ± 0,7
			utérus	97,6 ± 3,5	21,9 ± 1,9
			vagin	39,1 ± 2,1	17,3 ± 1,6
		Mâle	testic. 2	416,5 ± 17,1	173 ± 9,5
			épididyme ..	44,7 ± 2,3	29,8 ± 2
			vés. sém. ..	32,1 ± 1,9	17 ± 1,4
				Passent de 27 à 28,3	Passent de 27,5 à 28
En cystine	5 U. R. quotidiennes d'« Antelobine » pendant 12 jours	Femelle	ovaires	21,9 ± 1,7	7 ± 0,6
			utérus	121 ± 4,2	21,3 ± 1,5
			vagin	43 ± 2,2	18,1 ± 1,3
		Mâle	testicules ...	378 ± 16,4	183 ± 9
			épididyme ..	48,9 ± 2,1	29 ± 1,8
			vés. sém. ..	34 ± 1,7	16,8 ± 1,3

L'hypertrophie de l'appareil génital est considérable chez les animaux traités des deux sexes. Elle est cependant plus marquée chez les femelles : chez le mâle, seul le prolan B

agit, en hypertrophiant le tissu interstitiel et les annexes génitales, mais sans faire apparaître la spermatogénèse. Cet accroissement expérimental du germen aux dépens du soma peut être rapproché de divers phénomènes naturels analogues : les saumons qui remontent à jeun les rivières, en développant leurs produits génitaux aux dépens des muscles, sont un exemple de semblables transferts. Mais ici, il y a maintien du poids corporel ; le transfert s'opère donc avec un excellent rendement, même si l'on tient compte de la présence de petites quantités de lysine ou de cystine dans les régimes artificiels.

Ces faits ne sont pas particuliers aux animaux impubères : chez des femelles adultes, carencées en lysine, j'ai pu provoquer une hypertrophie considérable des organes génitaux, par un traitement prolongé avec un extrait d'urine de femme ménopausée (contenant surtout du prolane A). J'indiquerai seulement quelques chiffres représentant des moyennes :

4 animaux traités (poids 114 g.,8)	4 témoins (poids 109 g.,3)
Ovaires (2)	57 mg.,1 29 mg.,5
Utérus	330 mg. 166 mg.
Vagin	176 mg. 99 mg.,3

On peut donc obtenir, chez des animaux carencés assez âgés, sous l'impulsion des prolans, une reprise de croissance du germen aux dépens du soma, la masse totale de l'organisme restant constante.

Conclusions du chapitre III.

Je voudrais, en terminant, insister sur la concordance remarquable que l'on a pu observer, tout au long de ce chapitre, entre les résultats relatifs aux deux carences. Que l'animal manque de lysine ou de cystine, les variations expérimentales provoquées par le traitement hormonal portent sur les mêmes organes et sont de même sens ; elles dépendent de la nature de l'hormone et non pas de la déficience alimentaire. Il y aurait là un argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle lysine et cystine ne seraient que des matériaux inertes, servant à la construction de l'édifice protéique et mobilisables d'un point de l'organisme à l'autre, à l'appel de mécanismes fonctionnels dont l'accomplissement ne dépend

pas de la présence de ces acides aminés dans le régime. Seul serait inhibé par les carences, l'accroissement du poids corporel. Cette constatation peut paraître assez décevante ; elle sera encore fortifiée par les conclusions du chapitre suivant, où la lysine et la cystine nous paraîtront jouer, dans les premières étapes de la croissance, le rôle passif de matériaux de la synthèse protéique, n'intervenant, par exemple, dans la production du lait, que comme facteurs limitants de la quantité produite.

CHAPITRE IV.

EFFETS DES CARENCES EN LYSINE ET EN CYSTINE SUR LES PREMIÈRES PHASES DE LA CROISSANCE.

Les recherches exposées dans les chapitres précédents ont trait à des animaux s'alimentant directement : pour étudier sur des animaux plus jeunes (fœtus ou nourrissons) les effets d'une déficience alimentaire, il faut carencer la mère ; une telle méthode n'est pas sans reproche, car la croissance du jeune animal n'est ainsi que la résultante de transformations internes de l'organisme maternel, dont nous ignorons tout, mais c'est le seul procédé dont nous disposions. Cette réserve faite, je diviserai l'exposé en deux parties, consacrées à la gestation et à la croissance du nourrisson.

1) La croissance intra-utérine.

Elle a fait l'objet, chez le Rat, d'une minutieuse étude de STOTSENBURG [62]. Des chiffres de cet auteur, il résulte que les 12 premiers jours de la gestation, si importants pour la morphogénèse, sont, du point de vue quantitatif, pratiquement négligeables pour l'organisme maternel ; au 13^e jour, le fœtus, qui d'ailleurs est encore très hydraté, ne pèse que 0 g.,04 ; il pèse 4 g.,63 au 22^e jour, au moment de la mise bas : en 9 jours, la masse fœtale a donc centuplé. L'effet de déficiences azotées dans l'alimentation maternelle, sur des phénomènes de croissance d'une telle rapidité et d'une telle ampleur, n'a guère attiré l'attention des chercheurs. On a bien observé des cas de gestation au cours de l'inanition protéique, mais ils s'accompagnaient toujours d'une chute de poids considérable, témoignant d'une véritable fonte des tissus maternels au profit du fœtus. HART, NELSON et PITZ, dont j'ai cité, au début de ce mémoire, le travail sur la lactation [31], ont observé plusieurs cas de gestation complète chez

des Rates carencées en lysine ; pour la carence en cystine, il n'existe à ma connaissance aucune donnée de ce genre.

J'ai pu observer la mise bas de petits nombreux, de poids normal, bien constitués et viables, par des femelles carencées, soit en lysine, soit en cystine, durant 12 à 15 jours avant la parturition, et dont la masse globale (somme de la mère, des fœtus et des annexes) a notablement augmenté malgré la carence. Comment interpréter ce fait, qui, de prime abord, paraît difficilement explicable ? Y a-t-il synthèse de lysine et de cystine au cours de la gestation ? ALCOCK [4], observant des femelles gestantes rigoureusement carencées en tryptophane, les voit maintenir sensiblement leur poids jusqu'à la parturition : la transformation du tissu maternel en tissu fœtal s'opérerait avec un rendement apparent égal à l'unité, ce qui paraît invraisemblable, et l'auteur conclut à une synthèse de tryptophane par l'organisme maternel. On serait tenté d'envisager ici une semblable hypothèse, puisque la masse totale de l'organisme maternel non seulement se maintient, mais même augmente. Mais il faut se rappeler que le poids frais n'a pas la même signification chez l'adulte et chez le nouveau-né et que la même masse de tissus frais ne renferme pas la même quantité de protides secs, dans les deux cas.

HATAI [33], qui a fait une étude des variations de la composition chimique globale du Rat, en fonction de l'âge, indique, pour le Rat nouveau-né, une teneur en eau de 87,2 p. 100, alors qu'elle est de 69,6 p. 100 seulement, chez le Rat de 30 jours ; chez celui-ci, les protides forment 11,7 p. 100 du poids frais total ; ils n'en constituent que 7,3 p. 100 à la naissance. ROCHE et GARCIA [58, 59] ont récemment confirmé ces faits par des dosages d'azote : l'azote total représente 1,5 p. 100 du poids frais à la naissance, 2,5 p. 100 au 30^e jour : il faut donc moins d'azote et moins de protides pour fabriquer les 4 grammes d'un Rat nouveau-né, que pour accroître de 4 grammes la masse d'un rat de 30 jours, et, lorsqu'une masse donnée de tissu maternel se transforme en une masse égale de tissu fœtal frais, beaucoup moins riche en protides, le rendement de ce transfert doit être assez médiocre et voisin de 0,5.

Le raisonnement précédent suppose que la teneur en lysine et en cystine des protides secs n'est pas, chez le nouveau-né, très supérieure à ce qu'elle est chez l'adulte ; nous n'avons

malheureusement aucune donnée numérique sur ce point et il serait nécessaire d'effectuer des dosages de ces acides aminés sur des nouveau-nés *in toto*. J'ai réservé cette tâche, qui mériterait à elle seule une étude particulière, pour un travail ultérieur ; toutefois, il est très peu vraisemblable que la teneur des protides secs totaux en lysine et en cystine soit beaucoup plus élevée chez le nouveau-né ; au contraire : la musculature, particulièrement riche en lysine, ne représente que 26 p. 100 du poids frais, à la naissance, contre 45 p. 100 chez l'adulte (LOWREY) ; les phanères, particulièrement riches en cystine, manquent chez le nouveau-né, qui est nu, à l'exception des vibrisses.

Si nous admettons que les protides secs totaux du nouveau-né ne sont pas sensiblement plus riches en lysine et en cystine que ceux de la mère, ce qui semble plausible, le rendement des transferts au cours de la gestation nous apparaîtra assez médiocre, même chez une espèce à croissance intra-utérine très rapide, comme le Rat. Faute de dosages effectués sur des nouveau-nés, je n'ai pu établir de véritable bilan de la lysine et de la cystine au cours de la gestation, je voudrais cependant donner ici quelques indications numériques grossières, malheureusement assez arbitraires, qui pourront servir de point de départ à des recherches plus précises.

Pour quelques femelles carencées en lysine, j'ai déterminé la quantité totale de régime artificiel ingéré au cours de l'expérience de carence (en pesant les aliments donnés à l'animal, les restes après 24 heures, et en faisant la somme des ingestions quotidiennes). Connaissant la teneur en lysine du régime (0,12 p. 100), j'ai pu calculer la quantité totale de lysine ingérée par chaque femelle gestante. Connaissant d'autre part le poids total de la portée à la naissance, j'ai cherché à déterminer celui des annexes embryonnaires, que l'on ne peut avoir directement, car l'animal les mange d'ordinaire aussitôt après la parturition. Ayant sacrifié quelques femelles gestantes presque à terme, j'ai déterminé le poids relatif des annexes, qui est d'environ 10 p. 100 de celui des fœtus ; j'ai donc majoré uniformément de 10 p. 100 le poids total de chaque portée étudiée. J'ai cherché alors à évaluer la quantité de lysine consacrée à la formation des fœtus et des annexes. Pour cela j'ai assigné arbitrairement au nouveau-né une teneur en lysine de 0,73 p. 100 du poids frais ; cette estimation est fondée sur le raisonnement suivant : les protides secs

TABLEAU XIV.

Gestation de femelles carencées en lysine.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Numéro de l'animal	Durée de la carence	Poids initial de la mère 10 jours avant la parturition	Poids final de la mère	Q. totale de nourriture ingérée dans les 10 derniers jours de gestation	Quantité totale lysine ingérée dans le même temps	Nombre des petits	Poids de la portée (fœtus + annexes)	Poids de la somme (fœtus + annexes)	Quantité lysine contenue dans la col. 9	Quantité lysine empruntée aux tissus maternels	Quant. tissus maternels détruite au profit du fœtus	Quant. lysine fournie par la destruction des tissus maternels	Rendement des transferts
1	10 au 22 ^e j.	g. 207,9	g. 230,6	g. 127,5	mg. 153	10	g. 31	g. 34,1	mg. 249	mg. 96	g. 11,4	mg. 137	0,7
2	9 au 22 ^e j.	229,2	250,9	134	161	15	50	55	401	240	33,3	400	0,6
3	12 au 22 ^e j.	215,5	238,5	131	157	12	40	44	321	164	21	252	0,65
4	11 au 22 ^e j.	203	223,6	144	169	10	44	48,4	353	184	27,8	334	0,55
5	8 au 22 ^e j.	241	265,5	125	150	10	44	45,1	328	178	20,6	247	0,72
6	10 au 22 ^e j.	198	213,7	118	141	7	32,9	36,2	264	123	20,5	246	0,50
7	10 au 22 ^e j.	201	214,2	104	125	5	21,5	23,7	173	48	9,5	114	0,42

Colonnes 3, 4, 5, 8, 9, 12..... poids en grammes.

Colonnes 6, 10, 11, 13..... poids en milligrammes.

Colonne 11 = (colonne 10 — colonne 6).

Colonne 14 = colonne 11.

Colonne 14 = colonne 13.

du nouveau-né, comme l'a montré HATAI, constituent 7,3 p. 100 du poids frais ; d'autre part, j'ai estimé la lysine à 10 p. 100 du poids des protides secs ; une telle teneur, qui est celle des protides musculaires du Rat adulte, très riches en lysine, est certainement trop élevée pour l'ensemble des protides de l'organisme ; le chiffre de 0,73 p. 100 du poids frais est donc plutôt une limite supérieure que la véritable teneur en lysine des nouveau-nés, et cela ne fera que renforcer mes conclusions.

La différence entre la quantité de lysine (arbitrairement estimée), qui a été consacrée à l'édification des fœtus et des annexes, et la quantité de lysine, moindre, ingérée par la mère, représente la quantité de lysine empruntée par les fœtus aux tissus maternels. Cette quantité est assez faible, comme le montre le tableau XIV.

La gestation a dans tous les cas, duré 22 jours exactement (col. 2) ; je l'ai vérifié en rapprochant les dates de l'accouplement et de la parturition. La carence a commencé, au plus tard, le 12^e jour de la gestation : le poids d'un fœtus de 13 jours (0 g.,04) est pratiquement négligeable ; aussi peut-on estimer que la totalité de la masse fœtale a été élaborée au cours de la carence. Le poids final de la femelle gestante (col. 4) a été déterminé 12 heures au plus avant la parturition. La quantité totale de lysine ingérée (col. 6) a été calculée sur la base de 0,12 p. 100 de lysine dans la ration totale. La quantité de lysine correspondant à l'ensemble des fœtus et des annexes (col. 10) a été calculée sur la base de 0,73 p. 100 du poids frais total. La quantité de lysine empruntée aux tissus maternels (col. 11) est donnée par la différence entre les colonnes 10 et 6 ; (nous ignorons si toute la lysine ingérée est consacrée à la formation du fœtus, mais on peut admettre, en première approximation, et dans un bilan aussi grossier que celui-ci, que la lysine ingérée épargne, de quelque façon que ce soit, l'emprunt par le fœtus d'une quantité équivalente de lysine maternelle, provenant de la fonte tissulaire). Pour calculer le poids des tissus maternels détruits au profit des fœtus (col. 12) au cours de la gestation, j'ai déterminé le poids de la mère aussitôt après la mise bas, et déduit ce poids du poids initial, au début de la période de carence, 10 jours avant la parturition : la différence représente la quantité de tissus détruits. La teneur en lysine de l'organisme adulte est d'environ 1,2 p. 100 du poids frais total ; en se fondant sur

ce taux, on peut estimer la quantité de lysine libérée par la fonte des tissus maternels (au cas où cette fonte serait totale). (col. 13). Le rapport

$$\frac{\text{Lysine empruntée par les fœtus à la mère}}{\text{Lysine fournie aux fœtus par la fonte des tissus maternels}}$$

exprime le rendement du transfert de la lysine.

Pour obtenir les résultats précédents, il nous a fallu faire de nombreux calculs, et des estimations dont certaines, celle de la lysine fœtale, par exemple, sont évidemment arbitraires ; aussi cette grossière esquisse de bilan ne prétend-elle évidemment pas à l'exactitude ; elle nous fournit toutefois un ordre de grandeur. Comme il n'est pas possible d'éliminer totalement la lysine d'un régime à base de gliadine, la quantité de lysine qu'il faut prélever sur les tissus maternels pour assurer la croissance fœtale est assez faible ; le transfert de la lysine s'opère avec un rendement, qui, bien qu'inférieur à l'unité et n'impliquant pas de synthèse de lysine, est cependant fort bon (compris entre 0,4 et 0,7 environ). Ce fait, et aussi la moindre teneur du fœtus en substances sèches et en azote, expliquent que le poids global (somme de la mère, des fœtus et des annexes) puisse augmenter notablement malgré la carence. L'étude de la carence en cystine nous amènera aux mêmes conclusions : les données de cette étude sont rassemblées au Tableau XV.

Cette fois, la carence, instituée plus tôt, a duré tout le temps de la gestation. Compte tenu, d'une part de la cystine, qui, selon les dosages directs d'OSBORNE et MENDEL, ne représente que le tiers du soufre de la phaséoline et ne se trouve dans ce protide qu'au taux de 0,4 p. 100, et d'autre part, de la méthionine, qui peut fournir indirectement de la cystine en se dégradant dans l'organisme, l'apport total de cystine, par le régime à base de farine de haricots donné aux femelles gestantes, est de 0,05 p. 100 de la ration. Pour évaluer la cystine qu'exige la formation du fœtus, j'ai raisonné comme dans le cas de la lysine : les protides secs de l'adulte sont presque tous moins riches en cystine qu'en lysine ; ceux du muscle ne renferment que 3 à 4 p. 100 de cystine, contre 10 p. 100 de lysine environ ; l'osséine, l'hémoglobine n'en contiennent pas du tout ; par contre les phanères en sont fort riches : mais précisément, chez le Rat, le système pileux n'apparaît que quelques jours (6 ou 7) après la naissance. En assignant donc aux protides secs du nouveau-né une teneur en

TABLEAU XV.
Gestation de femelles carencées en cystine.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Numéro de l'animal	Durée de la carence	Poids de la mère au 10 ^e jour de gestation	Poids final avant la parturition	Quantité totale de nourriture ingérée dans les 10 derniers jours de gestation	Quantité totale de cystine ingérée dans le même temps	Nombre total des petits	Poids total de la portée	Poids de la somme fœtus + annexes	Quantité de cystine contenue dans la colonne 9	Quantité de cystine empruntée aux tissus maternels
1	22 jours	198,5	214	105	52,5	5	21	23,1	67	14,5
2	20 —	200	218,2	114	57	7	25,6	28,2	82	25
3	22 —	234,8	253	132	66	10	42	46,2	134	68
4	22 —	212,5	233,7	111	55,5	6	31	34,1	99	43,5
5	19 —	194,7	207,5	100	50	4	18	19,8	57,4	7,4
6	21 —	188,2	205	98	49	5	20	22	64	15

Colonnes n° 3, 4, 5, 8, 9... poids en grammes.
Colonnes n° 6, 10, 11 poids en milligrammes.
Colonne 11 = (Colonne 10 — Colonne 6).

cystine de 4 p. 100, ce qui représente 0,29 p. 100 du poids frais total, j'ai adopté un chiffre qui est très probablement excessif : la faiblesse des emprunts de cystine faits par le fœtus aux tissus de la mère n'en apparaîtra que plus accusée.

Pour arbitraires que puissent paraître les estimations conjecturales de la lysine et de la cystine fœtales, auxquelles je me suis livré, et si peu rigoureux que soient mes résultats numériques à ce sujet, on peut cependant tenir pour vraisemblables les conclusions suivantes :

1° Si l'on tient compte de l'apport alimentaire, et l'on sait que des quantités, faibles mais non négligeables, de lysine et de cystine sont présentes même dans les régimes les plus purifiés, on constate que le fœtus n'emprunte à l'organisme maternel que de médiocres quantités de ces acides aminés. Cette conclusion repose sur l'hypothèse, d'ailleurs vraisemblable, qu'il n'y a pas de différences considérables dans la constitution des protides secs, entre le nouveau-né et l'adulte.

2° La lysine et la cystine que le fœtus emprunte à la fonte des tissus maternels, sont transférées avec un rendement assez élevé mais toujours nettement inférieur à l'unité (oscillant de 0,4 à 0,7 selon les individus).

D'autre part, nous ne devons pas oublier que, durant les premières phases de la croissance, parallèlement à l'augmentation du poids frais global, se produit un rapide accroissement relatif du poids sec et de la teneur en protides : c'est sur la masse de protides synthétisés, non sur le poids frais atteint par l'organisme, qu'il faudrait juger de l'effet des carences azotées ; on conçoit que cet effet devienne de plus en plus sévère relativement à l'accroissement du poids frais, au fur et à mesure de l'enrichissement de l'organisme en azote.

2) La croissance du nourrisson.

L'enrichissement continu en azote, l'impossibilité de recourir à des transferts azotés directs, comme dans la gestation, accentuent les effets des carences en lysine et en cystine, après la naissance. La croissance du nourrisson reflète les variations quantitatives et qualitatives de la sécrétion lactée : celle-ci est nettement affectée par la carence en lysine, comme

TABLEAU XVI.
Croissance en poids de nourrissons allaités par une mère carencée.
A. Carence maternelle en lysine.

N° de l'animal	Poids initial de la mère au début (en g.)	Poids de la mère au 21 ^e jour (en g.)	Nombre de petits	Poids de la portée (en g.)	Nombre de petits laissés à la mère	Poids des petits laissés à la mère au début de la carence (en g.)	Croissance des nourrissons
1	276,9	230,1	10	44	6	26	Mère carencée dès la parturition. Poids total des jeunes au 14 ^e jour : 65 gr. (10,85 pièce). 3 succombent accidentellement au 15 ^e jour. Poids total des 3 survivants au 22 ^e jour : 33 gr. (11 pièce). Palier jusqu'au 34 ^e jour où les animaux sont sacrifiés.
2	238,5	230,8	5	21	3	12,3	Mère carencée dès la parturition. Poids total des jeunes au 11 ^e jour : 24 gr. Au 21 ^e jour : 29 g., 7. Succombent accidentellement le 22 ^e jour.
3	208	201,5	5	22,5	5	39	Mère carencée le 7 ^e jour après la parturition. Poids total des jeunes au 7 ^e jour : 39 gr. (7,8 pièce). Poids total au 17 ^e jour : 52 gr. (10,4 pièce). Palier, même poids au 29 ^e jour. Sacrifiés le 38 ^e jour avec poids total de 56 gr. (11,2 pièce).
4	212,5	203	5	20,4	5	28,5	Mère carencée le 4 ^e jour après la parturition. Poids total des jeunes au 4 ^e jour : 28 g., 5 (5,7 chacun). Poids total au 15 ^e jour : 42 gr. (8,4 pièce). Poids total au 27 ^e jour : 50 g., 5 (10,1 pièce).

TABLEAU XVI (suite).
Croissance en poids de nourrissons allaités par une mère carencée.
 B. Carence maternelle en cystine.

N° de l'animal	Poids initial de la mère au début (en g.)	Poids de la mère au 21 ^e jour (en g.)	Nombre de petits	Poids de la portée à la naissance (en g.)	Nombre de petits laissés à la mère	Poids des petits laissés à la mère au début de la carence (en g.)	Croissance des nourrissons
5	248,3	232,9	4	20	4	20	Mère carencée dès la parturition. Poids total au 15 ^e jour : 39 g.,2 (9,8 pièce). Poids total au 29 ^e jour : 43 g.,6 (10,9 pièce).
6	198,9	185,7	6	26	5		Mère carencée dès la parturition. Un petit succombe accidentellement le 4 ^e jour. Poids total des 5 survivants au 10 ^e jour : 40 g. (8 pièce). Poids au 14 ^e jour : 44 g. (8,8 pièce), au 23 ^e jour : 47 g.,5 (9,5 pièce), au 35 ^e jour : 60 gr. (12 pièce).
7	205	195,5	5	24,5	5	38	Mère carencée le 5 ^e jour après la naissance. Poids total de la portée au 5 ^e jour : 38 gr. Poids total au 16 ^e jour : 44 g.,5 (8,9 pièce). Poids total au 25 ^e jour : 52 g. (10,4 pièce).

l'ont déjà montré HART, NELSON et PITZ [31] ; j'ai observé le même phénomène pour la carence en cystine.

Il arrive souvent que la mère, troublée par le brusque passage de l'alimentation naturelle à un régime artificiel, délaisse ses petits, ou même les supprime ; le rendement d'une série d'expériences de ce genre est donc assez peu élevé : je n'ai tenu compte que des cas favorables où la mère a pris soin de ses petits et les a allaités jusqu'au 20^e jour. On trouvera rassemblés au tableau XVI quelques résultats numériques relatifs aux deux carences.

En règle générale, la croissance du nourrisson se poursuit, bien que très ralentie, durant environ deux semaines, puis un palier s'instaure, et ce pour l'une et l'autre carences. Ces deux premières semaines correspondent, chez le nourrisson normal, à une déshydratation rapide : pour voir s'il en était de même, pour les nourrissons de mère carencée, j'ai déterminé le poids sec total et la teneur en eau globale de quelques uns de ces nourrissons, âgés de 14 ou 15 jours ; la teneur en eau moyenne est de 75,4 p. 100 dans le cas de la carence en lysine, de 75,1 p. 100, dans le cas de la carence en cystine, soit sensiblement la même ; chez le nourrisson normal, la teneur en eau globale passe de 87,2 à la naissance, à 72,9 p. 100 au 15^e jour (HATAI [33]) ; les nourrissons de mère carencée, bien qu'un peu plus hydratés que les témoins de même âge, ont donc subi, dans l'ensemble, la même déshydratation, avec un léger retard. Comme d'autre part les dimensions relatives des organes ne sont pas altérées, et qu'il n'y a pas de surcharge graisseuse apparente, j'ai tout lieu de penser, (bien que n'ayant pas effectué de dosages d'azote total, faute d'un nombre suffisant d'animaux), qu'il s'est produit, en même temps que la déshydratation, un enrichissement en azote relativement au poids frais. La croissance des deux premières semaines, bien que très ralentie, représenterait donc une demande d'azote assez considérable.

Peut-on se faire une idée des transferts que nécessite la croissance du nourrisson ? J'en donnerai deux exemples, tirés de l'étude de la carence en lysine.

La femelle n° 2 a ingéré en 21 jours, 237 g.,5 de régime artificiel à 0,12 p. 100 de lysine, soit 285 mg. de lysine. Les 3 petits qu'elle a allaités, pesaient, à la naissance, 12 g.,3 et contenaient (au taux de 7,3 p. 100) 0 g.,898 de protides. Ils pesaient au 21^e jour, 29 g.,7 et contenaient alors, toujours en

prenant pour base les taux indiqués par HATAI, 11,4 p. 100 de protides, soit 3 g.,386. La différence (2 g.,488) représente la quantité de protides formés par les nourrissons. En attribuant, comme nous l'avons fait pour la gestation, aux protides secs, le taux de 10 p. 100 de lysine, manifestement exagéré, on obtiendrait une quantité de lysine de 248 mg.,8, légèrement inférieure à la quantité ingérée par la mère : on voit donc qu'il n'est nullement nécessaire d'admettre une synthèse de lysine par l'organisme maternel. Bien plus, la mère a perdu 17 g.,7 au cours de l'allaitement, ce qui, en admettant, comme précédemment, une teneur en lysine de 1,2 p. 100 des tissus frais chez l'adulte, représente 213 mg. En faisant la somme de la lysine ingérée (285 mg.) et de la lysine provenant de la fonte tissulaire, on obtient 498 mg. ; le rapport $\frac{248,8}{498}$ égal à 0,5, représente, de façon extrêmement grossière, le rendement total du transfert de la lysine au cours de l'allaitement ; il n'est pas mauvais, mais nettement inférieur à l'unité.

La femelle n° 1 nous offre un cas analogue, bien qu'un peu plus complexe que le précédent. L'ingestion totale de la mère, de la mise bas au 21° jour, est de 274 g., apportant 329 mg. de lysine ; la mère subit d'autre part une fonte tissulaire intense, perdant 46 g.,8 en 21 jours : ces 46 g.,8 représentent, au taux de 1,2 p. 100, 562 mg. de lysine ; l'apport total de cet acide aminé, à la fois à partir de la ration alimentaire et des tissus de la mère est de 891 mg. Par ailleurs, les 6 nouveau-nés laissés à la mère, pèsent ensemble, à la naissance, 26 g. et contiennent (au taux de 7,3 p. 100) 1 g.,918 de protides. Sur ces 6 nourrissons, les 3 morts accidentellement au 15° jour, et pesant ensemble 32 g.,5, contiennent, (au taux, plus élevé, de 10,8 p. 100 du poids frais) 3 g.,51 de protides ; les 3 survivants, qui pèsent ensemble 33 g. au 22° jour, contiennent alors (au taux de 11,4 p. 100 du poids frais) 3 g.,76 de protides ; la somme des protides de ces 6 animaux est de 7 g.,27 ; si l'on en déduit la masse des protides à la naissance (soit 1 g.,918), on a la quantité de protides formés par les nourrissons, soit 5 g.,352, représentant (au taux hypothétique de 10 p. 100 que nous avons précédemment admis comme limite supérieure), 535 mg. de lysine. Le rapport

Lysine gagnée par les nourrissons

Lysine alimentaire de la mère + Lysine provenant de la fonte des tissus maternels

est égal à 0,6, donc très voisin de celui auquel nous sommes arrivés dans l'exemple précédent.

Fait singulier, et qui est particulièrement net dans la carence en lysine et pour les portées nombreuses, les nourrissons dont le poids au 14-15^e jour, moment où commence le palier, est encore trop faible (inférieur à 10 grammes), éprouvent beaucoup de difficulté à passer, vers le 20-21^e jour, du régime lacté à l'alimentation directe : ils éparpillent souvent la nourriture artificielle que mange leur mère, et se laissent mourir de faim ; ou bien, s'ils l'absorbent, ils présentent des troubles intestinaux graves et fréquemment mortels. Peut-être les modifications histophysiologiques du tractus alimentaire, qui doivent marquer le passage du lait maternel à l'alimentation directe, s'accomplissent-elles imparfaitement chez les animaux dont la taille est demeurée trop petite : la question mériterait d'être reprise et précisée.

En tout cas, les « bilans » grossiers et très hypothétiques que j'ai dressés, pour la croissance globale du nourrisson, comme pour la gestation, m'ont amené aux conclusions suivantes :

1^o Il n'y a jamais lieu de supposer une synthèse de lysine ou de cystine par l'organisme maternel.

2^o Si l'on tient compte de l'apport alimentaire inévitable et de l'enrichissement azoté au cours de la croissance, les quantités de lysine et de cystine empruntées à la fonte des tissus maternels par le fœtus, et même par le nourrisson, sont médiocres. Ces quantités croissent avec l'âge. Tandis que la gestation peut s'accompagner d'un accroissement du poids global de la mère, la lactation entraîne toujours pour celle-ci une perte de poids.

3^o Le rendement des transferts est très moyen.

L'action des carences sur la sécrétion lactée se manifeste-t-elle en abaissant la quantité de lait produite, ou en modifiant la composition chimique du lait qui, moins riche en lysine et en cystine, serait impropre à assurer une croissance normale ? FOWLER, MORRIS et WRIGHT [27], qui ont suivi, chez la Vache, les variations de la production laitière, en fonction de la teneur en lysine de divers régimes naturels, se prononcent en faveur de la première hypothèse : la lysine alimentaire serait un facteur limitant de la quantité de lait produite. Chez le Rat, le lait, produit continuellement et en très petite quantité, est continuellement ingéré par les nour-

rissons ; il est donc pratiquement impossible d'estimer directement la quantité de lait produite par la mère ; quant à la composition chimique du lait, HATAI [33] a tenté de la déterminer indirectement, en recueillant, chez de très jeunes rats, le contenu stomacal aussitôt après ingestion (celle-ci étant continuelle on a ainsi du lait à divers états de la digestion) : selon l'auteur, le lait de Rat serait pauvre en eau (54,3 p. 100 seulement), très riche en graisses (31,6 p. 100) et assez riche en protides (10,1 p. 100), mais sur la composition de ces protides, nous n'avons aucune donnée, et, vu ce que l'on sait de la variabilité interspécifique et même intraspécifique des laits, nous ne pouvons transposer au Rat les renseignements en acides aminés des laits d'autres espèces.

Aussi ai-je eu recours à un procédé indirect, qui nous aidera à préciser l'action des carences sur la sécrétion lactée. J'ai réduit à un seul le nombre des nourrissons, dès la naissance, pour quelques mères carencées : la croissance du nourrisson unique est normale, comme l'indiquent les quelques chiffres suivants :

Femelle n° 11, carencée en lysine ; sur 6 petits, je lui en laisse un, qui, de 4 g.,5, passe à 16 g.,5 au 15^e jour et à 22 g.,5 au 22^e jour.

Femelle n° 12, carencée en lysine ; 5 petits ; le nourrisson unique passe de 4 g.,1 à la naissance, à 14 g.,8 au 15^e jour et à 21 g.,2 au 22^e jour.

Femelle n° 23, carencée en cystine ; 7 petits ; le nourrisson unique passe de 3 g.,8 à la naissance, à 15 g.,6 au 15^e jour, et à 23 g. au 22^e jour.

Femelle n° 25, carencée en cystine ; 5 petits ; le nourrisson unique passe de 4 g.,6 à la naissance, à 16 g. au 15^e jour, et à 21 g.,8 au 22^e jour.

Dans l'ensemble, la vitesse de croissance et le poids atteint au sevrage sont ceux de nourrissons normaux, lorsqu'ils sont allaités, au nombre de 5 ou 6, par une mère recevant un régime mixte naturel. Le nourrisson d'une mère carencée, lorsqu'il absorbe davantage de lait, est donc capable d'une croissance normale : comment interpréter ce fait ? Si le lait des rates carencées était modifié dans sa composition, et moins riche en lysine ou en cystine que le lait normal, on comprendrait évidemment que, par suralimentation, le nourrisson uni-

TABLEAU XVII.

Effet de la carence maternelle sur le poids de divers organes du nourrisson. (Poids d'organe en mg.)

A. Carence maternelle en Lysine.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Numéro de la portée	Nombre d'animaux	Age	Poids moyen final (en gr.)	Grandeur mesurée	Encéphale	Yeux	Reins	Foie	Cœur	Rate	Testicules	Poumons	Thymus	Tibia	Fémur
17	5	21 j.	9,9	poids frais..	929,3	85	202	413,4	59	28	43,5	129	17,4	24,9	25,1
				poids sec...	148,2	13	36,3	88,4	9,3	4,4	5,9	22,2		9,5	8,7
				p. 100 sec..	15,9	15,3	18	21,4	15,7	15,9	13,5	17,2		38	34,6
Témoins de même poids	6	8 j.	10	poids frais..	684	62	157	458,2	65	29	44	131,4	21,2	25,2	25,3
				poids sec...	84,1	6,5	22,9	93,2	9,4	4,2	5,7	20,9		6,8	5,8
				p. 100 sec..	12,3	10,5	14,6	20,7	14,5	14,4	12,9	15,9		27	23
19	6	27 j.	13,6	poids frais..	1127	91	281	902	91	46	59	158,5	24,3	47,7	50,9
				poids sec...	191	14,4	51,7	206,6	15,3	7,6	7,7	28,4		19,1	18,8
				p. 100 sec..	16,9	15,8	18,4	22,9	16,8	16,5	13,1	17,9		40	36,9
Témoins de même poids	4	11 j.	13,7	poids frais..	972	77	207	963	103	46	63,2	161	28,1	48,1	51,2
				poids sec...	125,1	9	33,9	211,8	16	7	8,3	27,2		14	13,4
				p. 100 sec..	13,8	14,7	16,4	22	15,6	15,3	13,1	16,9		29,1	26,2

TABLEAU XVII (suite).

Effets de la carence maternelle sur le poids de divers organes du nourrisson. — (Poids d'organes en mg.)

B. Carence maternelle en cystine.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Numéro de la portée	Nombre d'animaux	Age	Poids moyen final (en g.)	Grandeur mesurée	Encéphale	Yeux	Reins	Foie	Cœur	Rate	Testicules	Poumon	Thymus	Tibia	Fémur
35	4	19 j.	8,1	poids frais..	833	74,9	173	341	51	20	27,5	122	13,1	20,2	21,4
				poids sec...	427,7	11,2	30,3	72,3	8	3,1	3,6	20,5		7,3	7
				p. 100 sec...	15,3	15	17,5	21,2	15,7	15,5	13	46,8		36	33
Témoins de même poids	5	6 j.	8	poids frais..	581	54	127	384	55	22	27	119	17,5	20,4	21,3
				poids sec...	71,5	5,6	18,1	76,6	7,8	3,1	3,4	18,6		5,2	4,5
				p. 100 sec...	12,3	10,3	14,3	20,1	14,1	14,3	12,6	15,6		25,5	21,2
38	5	23 j.	14,1	poids frais..	1141	95,1	293	925	99	47	62	170	26	48	49,5
				poids sec...	190,5	15,2	54,5	242,7	46,9	7,7	8,2	31,1		19,7	18,5
				p. 100 sec...	16,7	16	18,6	23	17,1	16,5	13,2	48,3		41	37,3
Témoins de même poids	6	11 j.	14,5	poids frais..	980	79,3	205	981	108,5	49	61,5	172	31,5	47,5	49,8
				poids sec...	135,2	9,3	34,2	217,8	46,9	7,5	7,8	29,4		13,7	13,1
				p. 100 sec...	13,8	11,7	16,7	22,2	15,6	15,4	13	17,1		28,8	26,4
39	4	11 j.	21,4	poids frais..	1248	107,2	401	1591	129	70,5	103	217	44,3	63,9	72,5
				poids sec...	229,6	18,5	74,6	380,2	24,6	12,6	13,4	61		31	33,4
				p. 100 sec...	18,4	17,3	18,6	23,9	19,1	17,6	13	18,9		48,5	46,1
Témoins de même poids	4	21 j.	21	poids frais..	1187	99,3	293,5	1662	138,5	71	100,5	217	51,2	61,5	73,4
				poids sec...	211,2	14,4	51,4	400,5	25	12	13	40,4		20,6	21,3
				p. 100 sec...	17,8	14,5	17,5	24,1	18	17	13	18,5		33,6	29,1

que puisse arriver à absorber une quantité de lysine ou de cystine suffisante pour que la croissance soit normale. Mais une telle suralimentation entraînerait, chez le nourrisson unique, une véritable surcharge graisseuse, surtout avec un lait très riche en lipides comme le lait de Rat ; c'est d'ailleurs ce qui se produit lorsqu'on restreint le nombre des nourrissons d'une mère recevant un régime mixte normal, ou lorsqu'on fait allaiter par une Rate de jeunes souriceaux (PARKES [55]) ; dans ces divers cas, les nourrissons obèses ont un poids énorme relativement à leurs dimensions osseuses.

Par contre, lorsque j'ai réduit à un le nombre des petits allaités par une mère carencée, je n'ai jamais observé d'obésité : l'alimentation du nourrisson unique ne doit donc pas être surabondante ; et lorsqu'on laisse à la mère carencée un nombre normal de petits (5 ou 6), il doit y avoir, au contraire, sous-alimentation quantitative. La carence agirait donc en limitant la quantité de lait produite, et, pour les deux carences, on observerait, sur le nourrisson, les effets d'une même inanition partielle.

Une telle interprétation est confirmée par l'étude comparée des poids relatifs de divers organes, chez les nourrissons de mère carencée, soit en lysine, soit en cystine. On trouvera, au Tableau XVII, les poids moyens de divers organes pour chaque portée ; les témoins, de même poids, mais plus jeunes, proviennent de la même souche, et ont été allaités par des mères recevant un régime mixte naturel (pain, grains, salade).

De l'examen de ces quelques chiffres, on peut tirer une conclusion commune.

1° Les résultats sont les mêmes, pour les deux carences. On a vu, dans la première partie du chapitre II, que les poids relatifs des organes, chez le jeune Rat s'alimentant directement, n'étaient pas affectés de la même façon par la carence en lysine et par la carence en cystine. Dans la carence en lysine, nous avons observé un accroissement relatif du cœur, de la rate, des poumons, et le maintien en équilibre du foie, de l'hypophyse et des glandes surrénales ; dans la carence en cystine, il y avait maintien en équilibre du cœur, et des poumons, diminution de poids du foie, de la rate, des surrénales, de l'hypophyse. Dans le cas présent, l'identité des résultats nous ferait penser que nous observons, dans les deux cas les effets d'une même cause : la sous-alimentation quantitative

du nouveau-né. L'inanition partielle du nourrisson serait due à l'insuffisance quantitative de la production laitière. Nous rejoignons par là l'hypothèse en faveur de laquelle nous avons déjà apporté un premier argument.

2° La croissance rapide de l'encéphale, qui caractérise la première phase du développement chez le Rat, se poursuit chez les nourrissons inanitiés, ainsi que la croissance de l'œil et du rein. Ces deux derniers organes nous étaient déjà apparus, chez les animaux plus âgés, comme des systèmes privilégiés, relativement indifférents aux carences en lysine et en cystine. Il en est de même ici, où il s'agit d'une inanition globale, résultat indirect de la limitation du lait maternel.

3° Cette croissance partielle est compensée par une légère régression de quelques autres organes. La plupart des organes conservent, naturellement, les dimensions et le poids que comporte la masse totale de l'organisme.

3) Croissance et morphogénèse.

Les recherches précédentes m'ont mis en présence de nourrissons dont la taille était environ deux fois moindre que celle des témoins allaités par une mère non carencée. On sait combien profondes sont les transformations morphologiques que doit subir le jeune Rat, de la naissance au sevrage : si le Cobaye « naît adulte », le Rat nouveau-né est encore très imparfait ; à la naissance, les paupières sont soudées et l'œil histologiquement embryonnaire, les oreilles sont fermées, la denture est encore absente, ainsi que le système pileux, la courbure du crâne diffère nettement de celle de l'adulte. Toutes les transformations, qui marquent le passage du nouveau-né à l'adulte s'accomplissent durant la période de nutrition lactée. J'ai voulu voir si les dates, assez constantes, des principales étapes de la morphogénèse du nourrisson, étaient, ou non, modifiées par les carences. Ces dates sont indiquées, en nombre de jours après la naissance, au Tableau XVIII. (Les résultats relatifs aux deux carences ont été réunis).

On voit que les principales étapes morphologiques de la croissance du Rat s'accomplissent à la même date, quel que soit le poids de l'animal ; la morphogénèse, avec les transformations histologiques et les transferts d'azote qu'elle implique, se déroule donc uniquement en fonction du temps : le

développement du système pileux, par exemple, se produit, chez le nourrisson d'une mère carencée en cystine, à la même date que chez son frère allaité par une nourrice normale ; quant à la cystine nécessaire à la formation du poil, qui ne paraît nullement altérée chez le nourrisson, elle est sans doute prélevée sur d'autres régions de l'organisme .

TABLEAU XVIII.

Dates des principales étapes de la morphogénèse. (Temps en jours).

	Ouverture des oreilles	Apparition du poil	Eruption des incisives	Ouverture des yeux	Eruption de la première molaire
24 nourrissons de mère carencée	$3,2 \pm 0,4$	$5,8 \pm 0,5$	$9,5 \pm 0,2$	$16,1 \pm 0,8$	$19,1 \pm 0,2$
15 nourrissons de mère normale	$3,3 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,3$	$15,9 \pm 0,7$	$19,3 \pm 0,1$

La marche de l'ossification est également fonction de l'âge : chez le nourrisson, comme chez les animaux plus âgés étudiés au Chapitre II, le poids frais de l'os est celui qu'implique la taille de l'animal, le poids sec dépend de l'âge.

Il est d'autres processus dont l'accomplissement dépend à la fois de ces deux facteurs (âge et taille). Telle est la déshydratation de l'encéphale, caractéristique des premières semaines de la croissance, et qui traduit la myélinisation du système nerveux central : la teneur en substance sèche, de l'encéphale, chez les nourrissons de mère carencée, est plus élevée que chez les témoins plus jeunes et de même poids, moins élevée que chez les témoins de même âge pesant davantage, comme le montrent les quelques chiffres suivants : portée n° 17, nourrissons carencés 15,3 p. 100, témoins de même poids 10,5 p. 100, témoins de même âge 17,3 p. 100 ; portée n° 35, nourrissons carencés 15 p. 100, témoins de même poids 10,3 p. 100 ; témoins de même âge 16,7 p. 100. L'évolution du système nerveux central dépend donc à la fois de l'âge et du poids total de l'animal.

Enfin, les poids relatifs de la plupart des organes (à l'exception de l'encéphale, de l'œil et du rein) dépendent uniquement de la masse totale de l'organisme, sans rapport avec l'âge.

L'étude du nourrisson inanitié nous permet donc de distinguer, dans les premières phases de la croissance, ce qui dépend des conditions de nutrition, et ce qui ressortit à un déterminisme chronologique rigoureux, indépendant des conditions extérieures.

CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE.

I. Les carences en lysine et en cystine, qui entraînent l'arrêt de la croissance globale, ne maintiennent pas les animaux étudiés (Rat, Souris) en un véritable état d'entretien, comparable à celui de l'adulte.

a) Sous l'apparence d'un équilibre global, l'organisme est le siège de croissances et de régressions partielles et antagonistes, qui affectent différents organes, selon la nature de la carence et l'espèce animale étudiée. Toutefois, certains organes (rein, œil) se comportent, dans tous les cas, en systèmes autonomes, poursuivant leur croissance au détriment du reste de l'organisme.

b) Un certain nombre de processus physiologiques, dont l'accomplissement dépend normalement de l'âge atteint par l'animal (involution thymique, déshydratation et minéralisation du squelette, et constitution de la réserve saline de l'os, déshydratation de divers tissus, établissement de la spermatogénèse et du cycle ovarien, maintien de la périodicité du rythme génital), se déroulent strictement en fonction du temps, malgré l'arrêt de croissance, que l'animal soit carencé en lysine ou en cystine.

II. L'étude des relations entre les carences en cystine ou en lysine et les hormones qui règlent la croissance chez l'animal normal (hormone somatotrope du lobe antérieur de l'hypophyse et hormone thyroïdienne) aboutit aux conclusions suivantes.

a) Les animaux carencés, soit en lysine, soit en cystine, ne présentent pas les symptômes d'une insuffisance hypophysaire ou thyroïdienne.

b) L'administration prolongée à des animaux carencés, soit en lysine, soit en cystine, d'hormone somatotrope ou de thyroxine, dont l'action a été éprouvée sur des témoins recevant un régime naturel, ne rétablit pas la croissance.

c) L'action de ces hormones s'exerce cependant sur les tissus des animaux carencés dans la mesure où elle n'affecte pas

l'accroissement du poids global. Elle dépend uniquement de l'hormone employée et non de la nature de la carence. Elle consiste en la stimulation de diverses croissances partielles au détriment du reste de l'organisme, stimulation qui constitue une amplification expérimentale des phénomènes précédemment décrits : l'hormone somatotrope stimule la croissance de certains organes et viscères (rate, foie, yeux, surrénales) et des extrémités des membres ; la thyroxine provoque une hypertrophie générale des viscères aux dépens de la musculature et accélère le développement du squelette ; les prolans provoquent un développement considérable de l'appareil génital aux dépens des organes somatiques. Les tissus des animaux carencés réagissent donc comme ceux de l'animal normal à l'action des diverses hormones.

d) Puisqu'ils réagissent à l'action des hormones de croissance, et que, d'autre part, la masse globale ne peut s'accroître, c'est donc que la lysine et la cystine doivent être indispensables à la synthèse protéique, indépendamment de tout rôle fonctionnel possible.

.....L'identité des phénomènes dans l'une et l'autre carence, le fait qu'aucun processus physiologique essentiel ne paraît troublé, l'absence de relation avec les hormones de croissance, nous amènent provisoirement à considérer la lysine et la cystine comme des matériaux purement passifs de la synthèse protéique, dépourvus de rôle fonctionnel sur l'organisme considéré *in toto*, et cela parce qu'aisément mobilisés d'un point à l'autre, pour assurer des fonctionnements qui se déroulent nécessairement malgré les carences.

III. L'étude de l'action des carences en lysine et en cystine sur les premières phases du développement (croissance intra-utérine et croissance du nourrisson) vient encore à l'appui de cette conception.

a) La gestation s'accomplit normalement en dépit des carences. Comme il n'est pas possible d'éliminer totalement la lysine et la cystine des régimes artificiels, comme, d'autre part, le fœtus, très hydraté, est relativement pauvre en protides, les emprunts de lysine et de cystine faits aux tissus maternels ne doivent pas être très considérables ; il ne paraît jamais nécessaire de postuler une synthèse de ces composés par l'orga-

nisme maternel : les transferts s'accompliraient avec un assez bon rendement, cependant très inférieur à l'unité.

b) Les effets de la carence maternelle sur la croissance du nourrisson sont plus sévères : les transferts de la mère à l'enfant se font désormais indirectement, par l'intermédiaire du lait, et le jeune organisme, d'autre part, s'enrichit rapidement en azote, ce qui rend plus sensible l'effet de la carence sur le poids frais. La croissance du nourrisson est d'abord très ralentie, puis arrêtée, ce pour les deux carences.

c) Dans les deux carences, il semble qu'il y ait plutôt une limitation de la quantité de lait produite qu'un changement dans sa composition. En effet, la réduction à un du nombre des nourrissons permet une croissance normale ; cette croissance ne s'accompagne pas d'une surcharge grasseuse, et ne correspond donc pas à une suralimentation ; le nourrisson unique mange normalement et lorsqu'on laisse à la mère carencée la portée entière, il y a inanition partielle des jeunes. Les effets des deux carences sont les mêmes sur les proportions relatives des organes chez le nourrisson, alors qu'ils sont nettement différents chez les animaux s'alimentant directement ; c'est un argument de plus pour l'hypothèse d'une même sous-alimentation quantitative pour les nourrissons de mère carencée, que cette carence porte sur la lysine ou la cystine.

d) L'étude de la croissance relative chez le nourrisson permet de distinguer des phénomènes qui dépendent uniquement de la masse totale de l'organisme (taille de la plupart des organes), d'autres qui sont entièrement fonction de l'âge (étapes de la morphogénèse, croissance rapide de l'encéphale, des yeux et des reins, ossification), d'autres enfin qui dépendent à la fois de ces deux facteurs (déshydratation et myélinisation du système nerveux central, déshydratation de la plupart des tissus).

BIBLIOGRAPHIE DE LA PREMIÈRE PARTIE.

1. ABDERHALDEN und WERTHEIMER. — Beziehungen des Lebensalter zur Thyroxinwirkung. *Ztschr. f. ges. exp. med.*, 1929, **68**, 1.
- 1 bis. ACKERSON and BLISH. — *Poultry Sc.*, 1926, **5**, 162. Cité in MITCHELL and HAMILTON : The biochemistry of the amino-acids. *Amer. Chem. Soc. Monog.*, Séries 1929.
2. ALCOCK (R. S.). — The rôle of tryptophan in blood development. *Biochem. Journ.*, 1933, **27-1**, 754.
3. ALCOCK (R. S.). — Tryptophan deficiency. *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 1721.
4. ALCOCK (R. S.). — Synthesis of proteins *in vivo*. *Physiol. Review.*, 1936, **16**, 1.
5. ALLEN. — Cessation of mitosis in the central nervous system of the white rat. *Journ. Compar. Neurol.*, 1912, **22**, 547.
6. BEADLES, BRAMANN, and MITCHELL. — The relation between cystine deficiency in the diet and growth of hair in the white rat. *Journ. Biol. Chem.*, 1930, **88**, 623.
7. BERG and ROSE. — Tryptophane and growth. I. Growth upon a tryptophane deficient basal diet, supplemented at varying intervals by the separate feeding of tryptophane. *Journ. Biol. Chem.*, 1929, **82**, 479.
8. BURR and BURR. — A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Journ. Biol. Chem.*, 1929, **82**, 345.
9. BURR and BURR. — On the nature and rôle of the fatty acids essential in nutrition. *Journ. Biol. Chem.*, 1930, **86**, 587.
10. BUSCHKE, ZONDEK, und BERMAN. — Der hemmende Einfluss des Thalliums auf den Brunstzyklus der Maus. *Klin. Wochenschr.*, 1927-1, **15**, 683.
11. CAMERON and CARMICHAEL. — The comparative effects of parathyroid and thyroid feeding on growth and organ hypertrophy in the white rat. *Amer. Journ. Physiol.*, 1921, **58**, 1.
12. CAMERON and SEDZIAK. — The effect of thyroid feeding on growth and organ hypertrophy in adult white rats. *Amer. Journ. Physiol.*, 1921, **58**, 7.
13. CAMERON and MOORE. — The effect of thyroid feeding on rats on a vitamin deficient diet. *Transact. Roy. Soc. Canada*, 1921, **5**, 29.
14. CAMERON. — Results of feeding endocrine preparations to young white rats. *Abstr. of Communicat. To the II nd Intern. Physiol. Cong. Edimbourg*, 1923.

15. COLLIP, SELYE, and THOMSON. — Preparation of a purified and highly potent extract of growth hormone of anterior pituitary lobe. *Proc. of Soc. f. Exp. Biol. a. Med.*, 1933, **30**, 544.
16. COSTES. — Recherches expérimentales sur le sarcome de JENSEN. *Thèse de Médecine*. Alger 1934.
17. COURRIER et COSTES. — Cancer et acides aminés indispensables à la croissance. *C. R. Soc. biol.*, 1934, **115**, 631.
18. COURRIER et RAYNAUD. — Modifications génitales chez les animaux à croissance arrêtée par la déficience en lysine. *C. R. Soc. biol.*, 1934, **115**, 881.
19. DONALDSON. — The Rat. Data and reference tables. 2nd Edition. *Mem. of the Wistar Inst. Philadelphie* 1924.
20. DONALDSON and CONROW. — Quantitative studies on the growth of the skeleton of the albino rat. *Amer. Journ. Anat.*, 1919, **26**, 237.
21. EVANS. — The growth hormone of the anterior pituitary. *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 1935, **104-2**, 1234.
22. EVANS, LEPKOVSKY and MURPHY. — Vital need of the body for certain unsaturated fatty acids. *Journ. Biol. Chem.*, 1934, **106**, 431.
23. EVANS and LONG. — Characteristic effect upon growth, œstrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. *Proc. Nat. Acad. Sc., U.S.A.*, 1922, **8**, 38.
24. EVANS and LONG. — The effect of anterior lobe administered intraperitoneally upon growth and maturity and the œstrous cycle of the Rat. *Anat. Record.*, 1922, **23**, 19.
25. EVANS and SIMPSON. — Hormones of the anterior hypophysis. *Amer. Journ. Physiol.*, 1931, **98**, 511.
26. FINKS and JOHNS. — Studies in nutrition : II. The rôle of cystine in nutrition as exemplified by nutrition experiments with the proteins of the navy bean, *Phaseolus vulgaris*. *Journ. Biol. Chem.*, 1920, **41**, 379.
27. FOWLER, MORRIS and WRIGHT. — *Scottish Journ. of Agric.*, 1934, **17**, 261. Cité dans SMITH (A. H.) Nutrition in Annual. *Rev. of Biochem.*, 1936, **5**, Stanford University Press.
28. GAEBLER. — Some effects of anterior pituitary extracts on nitrogen metabolism, water balance, and energy metabolism. *Journ. Exp. Med.*, 1933, **57**, 349.
29. GARCIA. — Recherches sur l'ossification. *Thèse Sciences Montpellier*. Trévoux 1935.
30. HAMMETT. — The effect of thyroparathyroidectomy and parathyroidectomy at 100 days of age on the Ca, Mg, and P content of the ash of the humerus and femur of male and female albino rats. *Journ. Biol. Chem.*, 1923, **57**, 285.
31. HART, NELSON and PITZ. — Synthetic capacity of the mammary gland. Can this gland synthetize lysine ? *Journ. Biol. Chem.*, 1918, **36**, 291.

32. HATAI. — On the weight of the thymus gland of the albino rat according to age. *Amer. Journ. Anat.*, 1914, **16**, 251.
33. HATAI. — Changes in the composition of the entire body of the albino rat during the life span. *Amer. Journ. Anat.*, 1917, **21**, 23.
34. HOSKINS (M.). — The effect of acetyl-thyroxin on the newborn white rat. *Journ. Exp. Zool.*, 1927, **48**, 373.
35. JACKSON. — Changes in the relative weights of the various parts, systems and organs of young albino rats held at constant body weight by underfeeding for various periods. *Journ. Exp. Zool.*, 1915, **19**, 99.
36. JACKSON and STEWART. — The effects of inanition in the young on the ultimate size of the body and of the various organs of the albino rat. *Journ. Exp. Zool.*, 1920, **30**, 97.
37. LAFON. — Recherches sur les types de croissance chez la Souris. *Ann. Physiol. et Physico-chim. biol.*, 1934, **10**, 1177.
38. LAFON. — Evolution pondérale des organes chez la Souris carencée en lysine. *C. R. Ac. Sc.*, 1936, **203**, 955.
39. LAFON. — Etude biométrique de la carence en cystine chez le Rat. *C. R. Ac. Sc.*, 1937, **204**, 1139.
40. LAFON. — Données récentes relatives aux acides aminés indispensables. *Extrait du rapport du 2^e cong. internat. de la Soc. scient. d'hyg. alim.* A. 2-19., Paris, 1937.
41. LAFON et VEILLET. — Carence en lysine et fonctions génitales. *C. R. Soc. biol.*, 1938, **129**, 256.
42. LAFON et VEILLET. — Carence en cystine et fonctions génitales. *C. R. Soc. biol.*, 1938, **129**, 259.
43. LEE and LEWIS. — The effect of fasting, refeeding, and of variations in the cystine content of the diet on the composition of the tissue proteins of the white rat. *Journ. Biol. Chem.*, 1934, **107**, 649.
44. LEE and SCHAFFER. — Anterior pituitary growth and the composition of growth. *Journ. of Nutr.*, 1934, **7**, 337.
45. LIGHTBODY and LEWIS. — The metabolism of sulphur : XVI. Dietary factors in the relation to the chemical composition of the hair of the young white rat. *Journ. Biol. Chem.*, 1929, **82**, 663.
46. LOPEZ-LOMBA. — Etudes expérimentales et critiques sur l'avitaminose. *Thèse sciences*. Paris 1923.
47. MARTIN and GARDNER. — The trichogenic action of the sulfhydryl group in hereditary hypotrichosis of the rat. *Journ. Biol. Chem.*, 1935, **111**, 193.
48. MITCHELL, NEVENS and KENDALL. — The relation between the endogenous catabolism and the non protein constituents of the tissues. *Journ. Biol. Chem.*, 1922, **52**, 417.
49. MOMENT (G. B.). — The effect of the rate of growth on the post natal development of the white rat. *Journ. Exp. Zool.*, 1933, **65**, 359.

50. MORPURGO. — Uber die postembryonale Entwicklung der quergestreiften Muskeln von weissen Ratten. *Anat. Anzeig.*, 1898, **15**, 200.
51. OSBORNE and MENDEL. — The rôle of gliadin in nutrition. *Journ. Biol. Chem.*, 1912, **12**, 473.
52. OSBORNE and MENDEL. — A quantitative comparison of casein, lactalbumin, and edestin for growth and maintenance. *Journ. Biol. Chem.*, 1916, **26**, 1.
53. OSBORNE and MENDEL. — The nutritive value of the wheat kernel and its milling products. *Journ. Biol. Chem.*, 1919, **37**, 557.
54. OUTHOUSE and MENDEL. — The rate of growth. Its influence on the skeletal development of the albino rat. *Journ. Exp. Zool.*, 1933, **64**, 257.
55. PARKES. — Note on the growth of young mice suckled by Rats. *Ann. appl. Biol.*, 1926, **16**, 171.
56. PEARSON. — Effect of a lysine deficient diet on the oestrous cycle. *Amer. Journ. Physiol.*, 1937, **118**, 786.
57. ROCHE (A.). — Inanition protéique, réserves azotées et constitution des protéines musculaires. *Trévoux* 1933.
58. ROCHE (A.) et GARCIA. — Sur la composition du nouveau-né (Rat) au cours de la première période du développement. *C. R. Soc. de Biol.*, 1933, **112**, 1686.
59. ROCHE (A.) et GARCIA. — Constance du rapport entre la taille du squelette et la masse active chez le Rat. *C. R. Soc. de Biol.*, 1935, **120**, 160.
60. ROCHE (J.), DROUINEAU, FOUQUET et PASSELAIGUE. — Réparations de pertes azotées importantes et couverture des besoins alimentaires en protides ;
II. — Sur la participation des divers organes aux pertes azotées et à leurs réparations et sur le rôle physiologique de l'azote extractif des tissus. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 720.
61. SMUTS, MITCHELL and HAMILTON. — The relation between dietary cystine and the growth and cystine content of the hair in the rat. *Journ. Biol. Chem.*, 1932, **95**, 283.
62. STOTSENBURG. — The growth of the fetus of the albino rat from the 13 th to the 22 nd day of gestation. *Anat. Record.* 1915, **9**, 667.
63. SUGITA. — Comparative studies on the growth of the cerebral cortex *Journ. Compar. Neurol.*, 1918, **29**, 61.
64. TEEL and WATKINS. — The effect of extract containing growth principle of the anterior hypophysis upon the blood chemistry of dogs. *Amer. Journ. Physiol.*, 1929, **89**, 662.
65. TEISSIER. — Description quantitative de quelques croissances complexes *Ann. Physiol. et Physico-chim. biol.*, 1934, **10**, 359.

66. TERROINE. — Métabolisme de l'azote. I. — Dépenses, besoins, couverture. Presses universitaires de France. *Paris* 1933.
 67. VICKERY and LEAVENWORTH. — Modifications of the method for the determination of the basic amino-acids of proteins. The bases of edestin. *Journ. Biol. Chem.*, 1928, **76**, 707.
 68. WADEHN. — Versuche über die Einwirkung des Wachstums-hormone auf die Maus. *Biochem. Ztschr.*, 1932, **255**, 188.
 69. WHITE. — The production of a deficiency involving cystine and methionine, by the administration of cholic acid. *Journ. Biol. Chem.*, 1935, **112**, 503.
-

DEUXIÈME PARTIE.

Essai sur le besoin qualitatif d'azote chez un insecte : *Drosophila melanogaster*, Meig.

Introduction et Historique.

L'analyse qualitative du besoin d'azote s'est limitée à quelques espèces animales, que des caractères divers, abondance, robustesse, croissance rapide, voracité, désignaient au choix de l'expérimentateur. Tel est le cas du Chien, du Porc, et plus encore des petits rongeurs, la Souris et surtout le Rat ; cette dernière espèce, à elle seule, a fourni plus de données que toutes les autres. En tenant compte des études des agronomes sur les Ovins, les Bovins, et les oiseaux de basse-cour, on aurait une liste à peu près complète du matériel utilisé : nos connaissances proviennent donc de l'étude d'un petit nombre de types, ce qui explique peut-être la cohérence des résultats obtenus.

Les études récentes sur les vitamines ont montré l'extrême variabilité des besoins, d'une espèce à l'autre. Grâce à leur abondante flore bactérienne, les grands herbivores (Bœuf, Cheval) supportent aisément des avitaminoses mortelles pour les Rongeurs ; la privation de facteur B. 1. (aneurine), qui détermine rapidement chez le Pigeon une polynévrite aiguë, ne provoque chez le Rat qu'une carence fruste et diffuse ; le Cobaye est incapable d'effectuer la synthèse de l'acide ascorbique, dont le Rat se passe aisément. Il arrive même qu'on puisse, au sein d'une même espèce, constater d'importantes différences : c'est ainsi que BERTRAND et NAKAMURA [6] observèrent, dans un élevage de Souris soumises à des avitaminoses multiples, des individus présentant une très longue durée de survie, qu'ils regardèrent comme de véritables « mutants physiologiques ». A la lumière des observations précédentes,

on peut se demander si l'extension, à d'autres groupes animaux, des études limitées jusqu'ici aux Vertébrés supérieurs, ne révélerait pas de semblables différences dans les besoins azotés.

A l'autre extrémité de l'échelle zoologique, les importants travaux de LWOFF [24] et de ses collaborateurs sur les Protistes viennent à l'appui de cette conception : tandis que le Flagellé « *Polytoma uvella* » effectue la synthèse de ses constituants azotés à partir de sels ammoniacaux ou d'un seul acide aminé, le Cilié « *Glaucoma piriformis* » ne peut utiliser des protides incomplets, tels que la gélatine et la sérine. Plus exigeant que les Mammifères, il ne peut effectuer la synthèse de son protoplasme à partir des produits de l'hydrolyse diastasique totale du muscle (éreptone) : il lui faut un certain taux de polypeptides complexes provenant d'une hydrolyse ménagée.

Des résultats aussi inattendus montrent tout l'intérêt qu'il y aurait à instaurer une enquête générale sur le pouvoir de synthèse azotée dans le règne animal : telle n'est évidemment pas la prétention du présent travail, mais il m'a paru intéressant de rechercher sur un exemple précis, pris dans un groupe assez éloigné des Mammifères, si je retrouverais les faits classiques déjà mis en évidence chez ces derniers.

Le choix d'un matériel est, au premier abord, malaisé : beaucoup de groupes zoologiques, (Coelentérés, Spongiaires, Mollusques, Crustacés, Vers), se prêtent mal à des études de ce genre, soit qu'ils exigent une alimentation figurée, soit pour quelque autre difficulté d'élevage. Aussi les seules données précises que nous possédions déjà, en dehors des Vertébrés supérieurs et des Protistes, ont-elles trait aux têtards d'Amphibiens et aux Insectes.

PINCHERLE [30, 31] utilise les têtards comme réactif biologique, dans une étude sur la valeur alimentaire de différents laits [30] : les laits de Vache et de Chèvre ne permettent pas la métamorphose et entraînent une grande mortalité ; par contre, on obtient de bons résultats avec les laits de Femme et surtout d'Anesse ; l'inégale valeur alimentaire de ces laits est évidemment due à une différence de teneur en graisses, mais aussi à l'inégale qualité des protides. Une analyse plus poussée a montré à PINCHERLE [31] que la caséine, l'ovalbumine cuite, et surtout les protides du jaune d'œuf (même dé-

barrassés de tout lipide) constituaient de bonnes sources d'azote, tandis que la lacialbumine, le lactosérum, la peptone de muscle étaient inefficaces. Une étude plus approfondie du rôle individuel des acides aminés a été tentée par GUDERNATSCH et HOFFMANN [12] ; mais ces auteurs n'ont pu constituer un régime artificiel complet, et se bornent à prolonger la survie de tétards en inanition azotée, par l'adjonction de mélanges plus ou moins complexes d'acides aminés : la valeur de ces mélanges croît évidemment avec leur complexité, mais en aucun cas les auteurs n'ont pu obtenir la croissance complète, ni la métamorphose. Selon eux, certains acides aminés (lysine, cystine) favoriseraient la croissance, d'autres (phénylalanine) agiraient sur la différenciation ; mais il s'agit uniquement de croissance en dimensions et non en poids, puisque les tétards au jeûne azoté perdent du poids. En tout cas, nos connaissances sur la nutrition azotée des tétards sont loin de valoir, en précision et en solidité, les données que nous avons sur les Vertébrés supérieurs.

Les recherches sur la nutrition des Insectes ont surtout trait aux vitamines et ne fournissent qu'accessoirement des renseignements sur le besoin qualitatif d'azote. On trouvera dans le rapport détaillé d'UVAROV [37] une liste à peu près complète des travaux antérieurs à 1929. Peu de publications ont été depuis lors consacrées à cette question : on trouvera cependant quelques indications dans la revue critique, plus récente, de HOSKINS et CRAIG [17].

Nos connaissances portent sur plusieurs ordres d'Insectes : parmi les Orthoptères, les Blattides ont été étudiés par ZABINSKI [39, 40, 41] : leurs besoins azotés paraissent beaucoup moins complexes que ceux des Mammifères. La croissance est la même, que l'apport azoté soit constitué par l'ovalbumine, la gélatine, ou, simplement le glycocolle ; mais la présence de microorganismes symbiotes, fréquents dans ce groupe d'Insectes, est peut-être la véritable explication de cette étonnante capacité de synthèse. L'espèce *Blatella germanica*, étudiée par MAC-KAY [25], très voisine des Blattes de ZABINSKI, présente des exigences beaucoup plus strictes : elle utilise très bien la caséine, assez mal la gélatine et très mal la zéine.

Nous retrouvons la même variabilité chez les Coléoptères : le *Tribolium confusum* Duv., dont CHAPMAN [6 bis], puis SWEETMAN et PALMER [35] ont analysé les besoins alimentai-

res, est un matériel pratiquement stérile, tant sa flore bactérienne est pauvre et rare dans les conditions naturelles d'élevage ; il n'y a donc pas ici intervention de symbiotes. Or le *Tribolium*, s'il a des exigences très strictes en ce qui concerne les vitamines (SWEETMAN et PALMER), paraît par contre capable d'une large synthèse de tryptophane et de lysine (CHAPMAN), car la zéine assure une croissance normale. Dans le même ordre d'Insectes, l'*Anthrenus museorum* a des besoins azotés beaucoup plus stricts : s'il effectue normalement son développement sur un hydrolysât de soie (acides aminés de la fibroïne et de la sérécine), par contre, il dépérit sur gélatine ou sur un mélange artificiel d'acides aminés. De telles différences dans les besoins alimentaires ne sont pas pour surprendre, même entre espèces d'un même ordre, quand on songe à l'extrême variabilité des régimes alimentaires naturels chez les Insectes.

Chez les Diptères, la nutrition en milieu stérile de la mouche *Lucilia sericata* Meig. a été étudiée par MICHELbacher, HOSKINS et HERMS [27]. Ces auteurs, qui n'étudient pas la nutrition azotée, remarquent incidemment que l'emploi, comme seule source protéique, d'une caséine extrêmement purifiée, provoque la formation de pupes allongées, minces et souvent curvilignes, avortant fréquemment ; cette déficience peut être compensée par l'adjonction au régime de très faibles quantités de 1 (-) cystine. La *Lucilia* aurait donc des exigences azotées assez comparables à celles des Mammifères.

Un autre diptère, qui avait fait l'objet de diverses recherches concernant le besoin de vitamines, m'a paru constituer un bon matériel pour une étude sur le besoin qualitatif d'azote : la Mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster* Meig. Cet animal peut être élevé en grand nombre, aseptiquement, croît très vite (5 à 6 jours de croissance larvaire à + 26° C.), accomplit une synthèse azotée considérable au cours de la croissance, et peut subsister sur un milieu homogène et presque entièrement artificiel : autant de traits qui le désignaient à mon choix.

LOEB [23], le premier, crut avoir déterminé les besoins alimentaires de la *Drosophile* ; il employait un milieu nutritif très simple (saccharose, mélange salin, alanine) et le pouvoir de synthèse de la mouche lui paraissait aussi étendu que celui des bactéries les plus simples : en réalité, des levures di-

verses transportées par l'air se développaient sur cet excellent milieu de culture et fournissaient à l'insecte son aliment naturel.

GUYÉNOT [13], préoccupé de réaliser « la vie aseptique d'un organisme » et d'en préciser rigoureusement les conditions de nutrition, ne réussit pleinement que dans la première partie de sa tentative, mais il mit cependant en évidence plusieurs faits importants. Il montra que les glucides n'étaient pas utilisés par la larve de *Drosophile* et que les protides et les lipides constituaient la seule source énergétique, contrairement à ce qui se passe chez les Mammifères. Il employait, comme aliment azoté, la peptone pepsique de muscle de Bœuf, à la concentration optimum de 2 à 4 p. 100 du milieu total. Les lipides usuels (graisses neutres) se montrèrent inassimilables et les acides gras ne purent être assimilés qu'en combinaisons phosphorées complexes (lécithines). Un mélange artificiel composé d'une solution saline, de peptone de muscle, et de lécithine d'œuf, se montra déficient et ne permit pas la formation du corps gras ; les larves survécurent longtemps sans accroissement pondéral, devinrent filiformes puis moururent, le plus souvent sans avoir pupé, après une longue période de parésie. L'auteur put obtenir une croissance normale, suivie de pupaison puis de métamorphose, en ajoutant au régime artificiel précédent un extrait de levure ; il montra qu'il existait un ou plusieurs composés inconnus indispensables à la croissance larvaire de la *Drosophile*, solubles à chaud et à froid dans l'eau et l'alcool à 70°, présents dans la levure de bière et le foie de bœuf, leurs autolysats et leurs bouillons. Il rapprocha ces composés de la « Vitamine », alors récemment découverte par FUNK.

Ce travail de GUYÉNOT, pourtant le plus étendu et le plus rigoureux qui ait été consacré à la nutrition d'un Insecte, demeura inconnu des autres auteurs : BAUMBERGER [5], cherchant à élever la *Drosophile* en milieu stérile, y parvint par une technique différente, mais ne s'attacha guère à préciser le déterminisme chimique de la nutrition. BACOT et HARDEN [4] reprirent, en l'ignorant, la tentative de GUYÉNOT ; ils utilisèrent, comme aliment azoté, la peptone de caséine ; leur milieu de culture étant stérilisé à haute température, ils en conclurent à l'inutilité du facteur C, que la chaleur avait détruit. Par contre, la nécessité de la levure de bière leur parut

indiquer un besoin de « facteur B », alors non encore dissocié en ses divers constituants. La graisse de beurre se révéla également nécessaire, sans qu'on pût préciser s'il s'agissait là d'un besoin de facteur A ou simplement de la nécessité de certains acides gras ; au reste, les résultats de BACOT et HARDEN paraissent en contradiction avec ceux de GUYÉNOT sur ce dernier point : selon GUYÉNOT, en effet, la graisse de beurre n'était pas assimilable pour la *Drosophile*.

Enfin VAN T'HOOG a récemment consacré aux besoins de la *Drosophile* en vitamines un bref travail [38], sur lequel je m'étendrai plus longuement en discutant mes propres résultats.

Mon exposé sera divisé en trois chapitres d'inégale importance. Les deux premiers, plus brefs, seront consacrés, l'un à la définition du matériel employé, des techniques de préparation des milieux artificiels, de la stérilisation et du contrôle de la stérilité, l'autre à l'étude de l'indéterminé alimentaire. Il est nécessaire d'adjoindre à tous les milieux un extrait de levure ; je n'ai pu isoler le ou les composés indispensables ; je me suis toutefois efforcé d'en préciser la nature, en fractionnant les extraits, et en comparant les propriétés des fractions actives à celles des vitamines déjà connues par l'étude des Vertébrés. Une telle étude, si elle n'entre pas exactement dans le cadre d'une analyse du besoin qualitatif d'azote, en constitue cependant l'indispensable préface. Enfin, le troisième chapitre, le plus important, sera consacré à l'analyse des besoins azotés.

CHAPITRE PREMIER.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1) Le Matériel.

L'emploi d'un matériel homogène est une condition essentielle pour une étude de ce genre : les « stocks inbred » des généticiens, qui présentent toutes les garanties à cet égard, sont malheureusement très fragiles ; l'« inbreeding » y fait apparaître, à l'état phénotypique, des caractères physiologiques récessifs, le plus souvent défavorables. Le résultat est une moindre vigueur et une plus grande susceptibilité à l'égard de petites variations fortuites : j'ai pu constater par quelques recherches préliminaires sur de tels « stocks » (stock FLORIDA de Pasadena, stock GUYÉNOT de Genève) conservés depuis de nombreuses générations en cultures massives, qu'ils se comportaient de manière très inconstante à l'égard d'un même régime artificiel. Désireux d'opérer sur un matériel à la fois homogène et robuste, je me suis adressé à une population de *Drosophiles*, empruntée aux travaux de L'HÉRITIER [22] et dénommée « Babel » par cet auteur. Pour constituer cette population, des nombres égaux de mouches, appartenant à divers « stocks inbred », les uns de type sauvage, les autres de types mutants variés, avaient été introduits dans la même cage. La population provenant de cet ensemble de croisements fut conservée durant 3 ans (soit environ 100 générations de *Drosophiles*), avant que je m'en servisse pour mes expériences de nutrition. Durant ce long laps de temps, s'accomplit un double processus d'homogénéisation : a) une homogénéisation lente due à l'« inbreeding », b) une homogénéisation beaucoup plus rapide due à la sélection. Dans le milieu clos où vit la population, il y a une intense concurrence larvaire pour la nourriture, un très faible pourcentage des individus accomplissant leur évolution complète de l'œuf à l'imago. Le résultat de ce double processus est que la popu-

lation est très homogène. Ce matériel m'a donné des résultats très constants ; il est par ailleurs extrêmement robuste.

Conditions d'élevage de la population :

Elle vit dans une cage du type imaginé par L'HÉRITIER et décrit par cet auteur [22] : cage en bois, de 50 cm. de long, 25 cm. de large, et 15 cm. de profondeur, recouverte d'une plaque de verre et percée aux deux bouts d'un orifice d'aération finement grillagé. Le fond de la cage est percé de 20 trous, disposés sur deux rangs, et obturés chacun par un bouchon de liège ; sur chaque bouchon peut être soudé à la cire à cacheter un godet de cristal de 40 cm³ contenant la nourriture ; celle-ci est constituée par une culture fraîche de levure de boulangerie sur le milieu artificiel décrit par PEARL et ses collaborateurs [29] sous le nom de S 101 (gélose sucrée, additionnée d'une solution saline). On introduit un godet chaque jour, jusqu'au 20^e jour inclus, et, le 21^e jour, on remplace le godet n° 1 par un godet frais et ainsi de suite, assurant ainsi un renouvellement continu de nourriture.

La cage d'élevage est conservée à l'obscurité, dans un thermostat à $+ 26^{\circ} \text{ C.} \pm 0,2$.

2) Les conditions expérimentales.

a) CONDITIONS PHYSIQUES.

Elles sont les mêmes que pour la cage d'élevage où se trouve la population-souche : les tubes de culture contenant les milieux artificiels ont été placés à l'obscurité, à la température constante de $+ 26^{\circ} \text{ C.} \pm 0,2$.

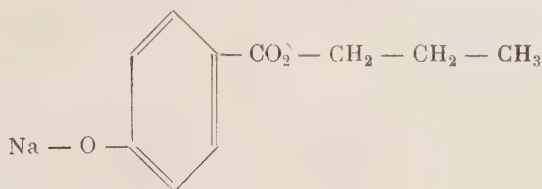
b) CONDITIONS BIOLOGIQUES.

La stérilité des milieux de culture est une condition essentielle de la validité des expériences. Les larves de *Drosophile*, à l'éclosion de l'œuf, représentent une masse extrêmement petite relativement à la masse du milieu nutritif : toute variation dans la composition du milieu peut donc avoir des répercussions considérables. La présence de microorganismes peut, en provoquant des fermentations, altérer gravement la composition du milieu. D'autre part, ces microorganismes

(Levures, Moisissures, Bactéries) peuvent servir d'aliment à la larve de *Drosophile* : le milieu nutritif ne joue plus alors qu'un rôle alimentaire indirect et l'expérience est dépourvue de sens.

Les procédés de stérilisation usuels sont, pour les milieux de culture, l'autoclavage ou l'adjonction d'antiseptiques, pour les animaux eux-mêmes ou leurs œufs, le traitement par un antiseptique. GUYÉNOT [13], qui aborda le premier le problème des cultures aseptiques de *Drosophiles*, le résolut par une technique ingénieuse, mais très délicate. Il réussit d'abord à obtenir une souche stérile, par passages successifs sur des milieux nutritifs divers, tous stérilisés à l'autoclave et défavorables à telle ou telle catégorie de bactéries, (utilisant ainsi un procédé bien connu des bactériologistes). Il conserva ensuite cette souche stérile sur des milieux autoclavés, la repiquant à l'aide d'une petite pompe aspirante et foulante d'un maniement assez délicat. BAUMBERGER [5] et, par la suite, BACOT et HARDEN [4] se contentèrent de stériliser les œufs, sans les tuer, à l'aide d'une solution antiseptique, et d'ensemencer, avec les précautions d'usage, un milieu stérilisé à l'autoclave. GUYÉNOT, qui avait d'abord songé à cette technique, avait employé des antiseptiques trop violents (sublimé, MnO_4K , eau oxygénée) qui, même à faible dose, tuaient l'œuf, très fragile, de la *Drosophile*..

J'ai repris l'idée de la stérilisation par un antiseptique en l'étendant au milieu nutritif. Il me fallait pour cela un antiseptique qui, tout en étant très actif à l'égard des microorganismes (Levures, Moisissures, Bactéries), fût cependant inoffensif pour la *Drosophile*. J'ai employé un dérivé de l'acide benzoïque, le paraoxybenzoate de propyle sodé



Ce composé, grâce à l'adjonction de la chaîne latérale propylique et de l'atome d'oxygène en position *para*, a des propriétés antiseptiques beaucoup plus actives que celles de l'acide benzoïque ; d'autre part, étant un phénate alcalin, il est hydro-soluble. On l'emploie techniquement, sous le nom commer-

cial de « *Nipagine sodée* », pour la protection des aliments sucrés contre les moisissures, et, comme bactéricide, pour la préservation de divers liquides injectables. Son action contre les moisissures lui a valu d'être employé par les généticiens américains, à très faible dose (0,5 à 1 pour 1.000), dans leurs milieux de culture sur mélasse ou banane. Ces faibles doses n'empêchent pas le développement des levures, qui sont l'aliment naturel de la mouche. A la dose beaucoup plus forte que j'ai constamment adoptée (0,5 pour 100), la « *Nipagine sodée* » est un antiseptique puissant, qui empêche la croissance de tout microorganisme. J'ai vérifié ce fait, en ensemençant avec des débris divers (larves, pupes, mouches, fragments de milieu), provenant de cultures ordinaires, non aseptiques, de *Drosophile*, deux séries de tubes de culture contenant de la gélose peptonée, les uns additionnés de « *Nipagine* » à la dose de 0,5 p. 100, les autres, non. Dans ces derniers, poussent rapidement, à l'étuve à 37° C, de nombreuses colonies bactériennes, aérobies et anaérobies, tandis que rien ne pousse dans les tubes contenant la « *Nipagine* ». Celle-ci est d'ailleurs un toxique violent pour diverses espèces animales : un essai sur des *Daphnies*, à la concentration très faible de 0,1 pour 1.000, s'est montré fatal à ces animaux.

La *Drosophile* jouit, à l'égard de la « *Nipagine* », d'une immunité particulière ; de plus, la population qui m'a servi de matériel expérimental constituait un génotype particulièrement robuste, à tel point qu'il fallait atteindre une concentration de « *Nipagine* » de 2 p. 100, pour arrêter tout développement. Avec des concentrations variant de 1 à 1,5 p. 100, on obtenait encore, sur les milieux de culture satisfaisant par ailleurs toutes les exigences alimentaires, le développement complet de quelques larves. A la concentration de 0,5 p. 100, la *Nipagine* n'a exercé aucune action nocive sur le développement larvaire.

Cet antiseptique présente un seul inconvénient grave, dû à sa nature chimique : étant un phénate de sodium, il est déplacé de sa combinaison alcaline par un acide même faible, et le paraoxybenzoate de propyle, insoluble, précipite dans l'eau (ce phénomène s'observe vers pH 5). Par ailleurs, comme l'a montré, le premier, GUVÉNOT, la *Drosophile* ne supporte pas l'alcalinité, et il convient d'acidifier légèrement les milieux, de préférence à l'acide acétique. Nous nous trouvons donc en

présence de deux nécessités opposées : éviter d'une part l'alcalinité funeste à la *Drosophile*, éviter d'autre part un excès d'acidité, qui entraînerait la précipitation de la « *Nipagine* » et ferait cesser l'asepsie du milieu. J'ai adopté une solution intermédiaire, en ajustant tous mes milieux, à l'aide d'acide acétique, à $\text{pH } 5,8 \pm 0,2$.

Contrôle de l'asepsie.

I. J'ai procédé, à de nombreuses reprises, à un contrôle bactériologique direct. Des fragments de milieux de culture « *Nipaginés* » (comprenant aussi des larves, des pupes et des imagos) furent transportés aseptiquement, selon les règles usuelles de la technique bactériologique, sur divers milieux, non antiseptisés, mais stérilisés à l'autoclave (gélose peptonée, gélose peptonée et glucosée, milieu S 191 de PEARL, gélatine, bouillon peptoné). Les ensemencements furent pratiqués, soit en surface, soit en profondeur, et les tubes, répartis en deux lots, furent placés, les uns dans un thermostat à $+ 26^{\circ} \text{C}$, les autres dans un thermostat à $+ 37^{\circ} \text{C}$. Il ne se développa aucune colonie, ni aérobie, ni anaérobie. Ces contrôles directs furent effectués 15 fois, pour des milieux de culture très variés.

II. Je n'ai jamais observé non plus, dans les milieux de culture « *Nipaginés* », l'apparition de colonies bactériennes ou mycéliennes ; l'examen microscopique direct de frottis de milieu colorés au panchrome ne m'a pas montré de microorganismes.

III. Les résultats de mes recherches constituent une preuve indirecte de l'asepsie des milieux nutritifs. On sait quel excellent milieu de culture constitue la gélatine pour la plupart des espèces microbiennes : or la peptone de gélatine n'assure pas la croissance de la *Drosophile* et doit être complétée, pour devenir efficace, par un supplément azoté complexe. L'existence de cette déficience, et les nombreuses autres carences que j'ai pu instituer, seraient à peine concevables dans des milieux nutritifs peuplés de microorganismes et subissant des fermentations diverses.

3) Marche générale des expériences.

On sait que la *Drosophile* adulte peut demeurer très longtemps en entretien apparent (avec, chez la femelle, arrêt de

la ponte) sur gélose saccharosée. Cette très faible sensibilité à l'inanition protéique fait de l'imago un matériel peu favorable à l'étude du besoin qualitatif d'azote. Aussi toutes mes recherches portent-elles sur les besoins nutritifs, beaucoup plus complexes, de la larve. Rappelons, à ce propos, qu'il ne peut être question de distinguer ici un besoin d'entretien et un besoin de croissance, comme on le fait pour les Mammifères : toute larve qui ne se transforme pas en pupe finit par succomber, et la survie plus ou moins longue d'une telle larve ne peut être assimilée à un véritable entretien. Nous serons amenés, par contre, à distinguer trois éventualités : les larves peuvent succomber rapidement sans croître (ce sera le cas de la carence en tryptophane et des mélanges artificiels d'acides-amino) ; elles peuvent croître, d'une manière anormale, sans formation du corps gras, devenant filiformes et succombant sans avoir pupé (nous observerons ce phénomène chez les larves carencées en arginine et en histidine) ; enfin, après avoir eu une croissance à peu près régulière, la larve peut se transformer en une pupe irrégulière et recroquevillée, qui ne se métamorphose pas (ce sera le cas de la carence en cystine). Une telle distinction n'a qu'un caractère statistique, la variabilité individuelle étant considérable ; elle exprime néanmoins le comportement de la grande majorité des individus.

Dans ses recherches sur les cultures de Protistes en milieu aseptique, Lwoff [24] insiste à juste titre sur la nécessité d'obtenir plusieurs générations successives sur un milieu artificiel donné, avant d'affirmer que ce milieu est complet. En effet, les individus fondateurs peuvent avoir apporté avec eux certains composés indispensables, et ce n'est qu'à la deuxième ou à la troisième génération que les effets de cet apport peuvent être considérés comme négligeables. Dans toutes les recherches que j'ai effectuées, j'ai tenu compte de cette objection. Chaque problème particulier a donné lieu à plusieurs séries d'expériences. Toujours au moins une série a été poursuivie durant 2 générations : une première génération ayant été obtenue sur milieu artificiel, depuis l'éclosion de la larve à partir de l'œuf jusqu'à l'éclosion de l'imago à partir de la pupe, les jeunes imagos ont été transportées dans des tubes de culture frais où elles ont été laissées 48 heures, pour pondre ; une deuxième génération a été obtenue à partir des œufs pondus, dans les mêmes conditions que la première.

a) COMPOSITION DES MILIEUX ARTIFICIELS.

STABILISATION DES MILIEUX. — GUYÉNOT avait eu recours au coton hydrophile, qui présente le grave inconvénient d'une dessiccation rapide en surface : souvent les larves ne peuvent pénétrer la couche superficielle desséchée et périssent d'inanition. J'ai préféré au coton la gélose, à raison de 1 p. 100 du milieu total. Des essais comparatifs sur coton et sur gélose m'ont donné des résultats identiques au point de vue chimique : on peut en conclure que la gélose, composée essentiellement de pentosanes, ne joue aucun rôle dans la nutrition de la larve. Au taux de 1 p. 100, elle donne une gelée assez ferme pour que les larves ne s'y noient pas, assez fluide pour qu'elles puissent la pénétrer, assez homogène pour que les divers constituants du milieu, y compris la « *Nipagine* », y restent dissous comme dans un liquide.

ALIMENTS MINÉRAUX. — Dans toutes mes recherches, j'ai employé une même solution saline, décrite par GUYÉNOT sous le n° 197, et que j'ai légèrement modifiée. D'une part, pour éviter une trop forte acidification du milieu, qui eût pu faire précipiter la « *Nipagine* », j'ai supprimé l'acide acétique ; d'autre part, cette suppression m'a amené à remplacer le phosphate monocalcique (qui en milieu neutre, eut réagi sur les autres constituants, en se transformant peu à peu en phosphate tricalcique insoluble), par une faible quantité de chlorure de calcium. Je me suis arrêté à la composition suivante : PO_4KH_2 — 41 g.,6 ; $(\text{MgCl}_2 \ 6 \ \text{H}_2\text{O})$ — 3 g.,2 ; SO_4Na_2 — 1 g.,6 ; $(\text{CaCl}_2 \ 6 \ \text{H}_2\text{O})$ — 2 g. ; H_2O — Q. S. pour 1.000 cm³. 10 centimètres cubes de cette solution saline servent à la confection de 100 cm³ de milieu total.

GLUCIDES. — GUYÉNOT a montré qu'ils étaient, non seulement inutiles à la larve, mais même inassimilables par elle (on voit que la nutrition larvaire et la nutrition imaginaire sont tout à fait différentes). Aussi n'ai-je pas mis de glucides dans mes milieux : c'est là une précaution supplémentaire, non négligeable, contre toute invasion mycélienne. Par contre un tel régime n'est guère favorable à l'adulte, pour qui les glucides constituent un aliment énergétique excellent (mais mes expériences portent uniquement sur la nutrition larvaire).

LÉCITHINE. — Comme GUYÉNOT, j'ai utilisé la lécithine d'œuf, d'abord la lécithine de BYLA, puis la lécithine, dite « très pure » de MERCK. Ces produits sont évidemment des mélanges de diverses lécithines, précipitées ensemble par l'acétone. Pour introduire « la lécithine » dans les milieux, j'ai procédé ainsi. La lécithine est intimement mélangée dans un mortier avec une très petite quantité d'alcool éthylique ; on obtient ainsi une phase liquide homogène (sorte de solution de l'alcool dans la lécithine), qui se trouble par addition ultérieure d'alcool. On ajoute de l'alcool jusqu'à avoir 5 cm³ d'alcool à 95° pour 1 g. de lécithine : celle-ci étant présente dans tous les milieux à la dose de 0,5 p. 100, cela représente 2 cm³,5 d'alcool pour 100 cm³ de milieu. Le mélange lécithine-alcool est alors versé goutte à goutte dans le milieu gélosé chaud, en agitant constamment ; il se forme une émulsion de lécithine qui donne à tous les milieux un aspect légèrement laiteux, et qui demeure très stable après refroidissement de la gélose.

PEPTONES. — L'aliment azoté, dans beaucoup d'expériences, était constitué par des peptones commerciales de divers protides : pour éliminer toute trace du protide originel, coagulable à chaud, j'ai toujours dissous ces peptones dans l'eau bouillante et filtré la solution avant usage.

EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE DE LEVURE. — Sa préparation sera décrite au chapitre suivant.

b) CONFECTION DES MILIEUX.

D'une part, dans une éprouvette graduée, on introduit la solution de peptone (2 g. dans 20 cm³ d'eau), la solution saline (10 cm³) et l'extrait de levure (10 cm³), et on complète à 50 cm³ avec de l'eau distillée. D'autre part, dans une capsule, on fait chauffer à feu doux, dans une faible quantité d'eau, la gélose (1 g.), qui a été coupée en petits morceaux, lavée et mise à gonfler dans l'eau durant 24 heures auparavant. Quand elle est entièrement dissoute, on ajoute la « Nipagine » jusqu'à dissolution complète, puis on verse le mélange lécithine-alcool, qui s'émulsionne. L'émulsion gélosée chaude est alors complétée à 50 cm³ avec de l'eau distillée, puis versée dans l'éprouvette qui contient les autres constituants : on mélange intimement avec un agitateur, et le milieu nutritif antiseptisé

est alors versé dans des tubes cylindriques (de contenance 60 cm³), à raison de 25 cm³ par tube. Ces tubes, qui ont été préalablement ébouillantés, sont aussitôt bouchés avec un coton passé à la flamme. Ils peuvent être aisément conservés 2 ou 3 jours à la glacière avant usage, pour éviter toute dessiccation. La gelée nutritive n'est le siège d'aucune fermentation perceptible à la vue, ou à l'odorat ; avec le temps, elle se dessèche et se réduit à un très faible volume. L'examen bactériologique direct ne m'y a pas fait découvrir de microorganismes.

c) ENSEMENCEMENT DES MILIEUX.

Dans la cage d'élevage où se trouve la population-souche, on dispose des godets de cristal, contenant l'aliment habituel de la population (culture de levure sur gélose sucrée), et surmontées de bandes de papier filtre humectées d'eau distillée ; les mouches pondent sur ces bandes des amas d'œufs compacts. Après 24 heures, on retire les godets, et les bandes de papier filtre, débarrassées de levure, sont trempées durant 3 minutes dans une solution de « Nipagine sodée » à 0,5 p. 100, ajustée à pH 6, pour les laver et les aseptiser. Les œufs restent adhérents à la bande de papier filtre, qui est ensuite découpée avec de fins ciseaux en petits carrés de 3 à 4 mm. de côté. Ces carrés, qui portent plusieurs centaines d'œufs, sont transportés chacun à l'aide d'une pince fine, à la surface d'un tube de culture, qui est aussitôt bouché au coton, puis transporté à l'étuve ; (les instruments servant au transfert, ciseaux et pinces, sont flambés avant usage).

Cette technique, fondée sur l'emploi d'un antiseptique, et jointe à quelques précautions classiques des bactériologistes, a le mérite de la simplicité et de la rapidité ; elle est d'autre part plus sûre que la stérilisation à l'autoclave, car il peut toujours se produire une contamination accidentelle des milieux stérilisés par la chaleur, ne serait-ce qu'au cours des ensemencements. L'antisepsie du milieu nutritif nous garantit contre une telle éventualité, et le contrôle bactériologique direct nous permet d'en être assurés.

CHAPITRE II.

L'INDÉTERMINÉ ALIMENTAIRE NON-PROTÉIQUE.

Pour analyser avec précision le besoin qualitatif d'azote, il faudrait employer un régime artificiel entièrement défini : l'existence d'un « indéterminé alimentaire » risque de fausser les résultats des expériences de nutrition, car, avec les principes inconnus, indispensables en petite quantité, on peut introduire aussi de l'azote protéique de nature non précisée. GUYÉNOT, pour obtenir une croissance larvaire normale, suivie de métamorphose, avait été amené à joindre un extrait de levure à son régime artificiel. Je me suis efforcé de préciser la nature de cet « indéterminé alimentaire ». Si je n'ai pu réussir à isoler les principes, analogues aux vitamines, qui sont nécessaires à la *Drosophile*, du moins suis-je parvenu à fractionner les extraits actifs, à les débarrasser en grande partie de leur azote protéique, et à esquisser une comparaison des exigences en vitamines de la *Drosophile* avec celles des animaux supérieurs.

Deux questions distinctes seront successivement traitées au cours de ce chapitre : 1° la *Drosophile* a-t-elle besoin des vitamines que nous savons être nécessaires aux Vertébrés supérieurs ? 2° Sinon, de quelle nature sont les principes vitaminiques particuliers à la *Drosophile* ?

1) La *Drosophile* et les vitamines déjà connues.

Divers auteurs ont employé des milieux de culture autoclavés, ce qui exclut déjà le facteur C (acide ascorbique), thermolabile, des substances nécessaires à la *Drosophile*. Restent, parmi les vitamines connues, deux grands groupes : les vitamines liposolubles et les vitamines hydrosolubles.

a) LES VITAMINES LIPOSOLUBLES.

On connaît dans ce groupe les facteurs A (dérivés du carotène), D (dérivé des stéroïdes) et E (tocophérol).

LE FACTEUR A. — BACOT et HARDEN avaient conclu à la nécessité de la graisse de beurre, sans préciser s'il s'agissait d'un besoin général de lipides ou d'un besoin de facteur A. Pour préciser ce point, j'ai tenté de purifier les divers constituants de mon régime artificiel. J'ai épuisé par l'éther la peptone pepsique de muscle, et je l'ai ensuite extraite durant 48 heures, par l'alcool, à l'appareil de KUMAGAWA. J'ai délipidé soigneusement l'extrait de levure en le préparant ainsi : le bouillon de levure a été filtré à froid, évaporé au bain-marie, puis repris à froid par l'alcool à 70° ; l'extrait hydroalcoolique filtré, de nouveau évaporé à sec, a été repris par un peu d'eau froide. On peut considérer que ni la peptone, ni l'extrait de levure, ainsi traités, ne contiennent de facteur A. La solution saline et la gélose n'apportent évidemment pas de lipides, pas plus que la « Nipagine ». Reste la lécithine ; j'ai pu constater qu'elle ne donnait pas (même en quantité assez importante : 2 à 3 mgr.) la réaction de CARR et PRICE, caractéristique du facteur A (coloration bleue en présence de trichlorure d'antimoine en solution chloroformique) (1). Le milieu artificiel total, où la lécithine est en très faible proportion (0,5 p. 100), donne *a fortiori* une réaction négative.

Un tel milieu, que l'on peut estimer exempt de facteur A, s'est montré aussi satisfaisant que les milieux non purifiés, soit que la mouche n'ait pas besoin de facteur A, soit qu'elle puisse en effectuer la synthèse.

Autres facteurs liposolubles.

J'ai fait subir à la lécithine une saponification d'abord modérée, puis totale, à la potasse alcoolique. Après saponification totale, la lécithine, dite « très pure », de MERCK, cède une quantité encore importante (7 à 8 p. 100) d'insaponifiable. Des essais pratiqués avec cet insaponifiable m'ont montré qu'il était aussi actif que la lécithine initiale : probablement les divers lipides reconnus nécessaires par les différents auteurs (graisse de beurre, par BACOT et HARDEN, huiles d'olive

(1) Cette réaction permet de déceler jusqu'à 1 ou 2 γ de vitamine A. Mes milieux contenaient donc moins de 1 γ de vitamine A par 100 cm³.

et d'arachide, par VAN T'HOOG) n'agissent que comme véhicules de principes insaponifiables, indispensables en faible quantité (0,04 p. 100 du milieu artificiel total, pour l'insaponifiable qui contamine la lécithine). Peut-être s'agirait-il de stérols : cette recherche m'eût entraîné trop loin de mes études sur la nutrition azotée. En tout cas, le corps gras de la larve peut se former à partir d'une alimentation dont la seule source énergétique est constituée par des protides, l'insaponifiable ne jouant que le rôle d'un apport vitaminique.

b) LE GROUPE DES VITAMINES HYDROSOLUBLES.

Nous avons déjà conclu à l'inutilité du facteur C : restent les divers facteurs B, présents dans la levure : on distingue présentement les facteurs B 1 (aneurine), B 2 (flavines), B 3 (adénine) et divers autres facteurs mal définis au point de vue chimique. L'extrait de levure que j'emploie contient ces divers facteurs : pour le préparer, j'ai adopté la technique d'OSBORNE et WAKEMAN [28], en lui apportant quelques modifications. La levure sèche de BYLA est délayée, par petites portions, dans cinq fois son poids d'eau distillée bouillante, acidulée par l'acide acétique à 1/1000°. Après 10 minutes d'ébullition, on filtre et on reprend la levure par l'eau bouillante acidulée ; les extraits réunis sont concentrés au bain-marie, au cinquième du volume initial, puis filtrés à froid. Le filtrat clair est ensuite additionné d'alcool à 95° jusqu'à ce que la concentration en alcool atteigne 70° : l'abondant précipité inactif (glycogène, sels, protides, bases puriques et xanthiques, etc...) est rejeté et le filtrat alcoolique clair est alors additionné d'alcool absolu, jusqu'à ce que la concentration en alcool atteigne 90°. Le précipité gommeux jaune, déterminé par cette nouvelle addition, est actif ; on le lave à l'alcool absolu froid et à l'éther, puis on le redissout dans un peu d'eau distillée. L'extrait aqueux final contient 5 p. 100 de substance sèche et est actif à la dose de 10 p. 100 du milieu artificiel, soit 0,5 p. 100 d'extrait sec par rapport au milieu total. Cette fraction active est encore très impure ; bien que la coagulation par la chaleur et la précipitation par l'alcool à 70° à froid aient éliminé la plus grande partie des protides, l'extrait donne encore la réaction du biuret ; mais il est susceptible de purifications ultérieures qui n'altéreront pas son activité..

Pour voir si les principaux facteurs B connus étaient indispensables à la *Drosophile*, j'ai soumis cet extrait de levure à divers traitements, destinés à éliminer certains de ces facteurs.

LE FACTEUR B 1 (ANEURINE). — On sait que ce composé est détruit par un autoclavage prolongé (2 heures à 130° C.) Je ne pouvais songer à soumettre un milieu gélosé et lécithiné, à une température aussi élevée et pendant un aussi long temps, sans risque d'altération. Mais la gélose ne contient pas d'aneurine. Quant à la lécithine, elle eût pu en contenir par contamination, puisqu'elle provient du jaune d'œuf, particulièrement riche en aneurine : je l'ai dissoute dans l'éther, qui ne dissout pas l'aneurine, et je l'ai précipitée par l'acétone, de sa solution éthérée, de manière à avoir une lécithine exempte à coup sûr de facteur B 1. J'ai soumis à l'autoclavage prolongé à haute température (2 séances de 3 heures chacune à + 130° C.) l'ensemble des autres constituants (solution de peptone de muscle, solution saline, extrait de levure). Le milieu artificiel total ainsi privé de facteur B 1, et antiseptisé à la « Nipagine », se montre cependant satisfaisant, comme l'indiquent les chiffres suivants :

Milieu privé de B 1 : Tube 9 : Pupes 53. Imagos 37 — Tube 10 : Pupes 41. Imagos 25 — Tube 11 : Pupes 37. Imagos 32 — Tube 12 : Pupes 65. Imagos 51 — Total de 4 tubes : Pupes 196. Imagos 145.

Milieu normal témoin : Tube 20 : Pupes 67. Imagos 50 — Tube 21 : Pupes 75. Imagos 50 — Tube 22 : Pupes 40. Imagos 24 — Tube 23 : Pupes 55. Imagos 40 — Total de 4 tubes : Pupes 237. Imagos 164.

L'expérience a été renouvelée quatre fois, avec toujours le même résultat (indifférence à l'égard du facteur B 1).

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de VAN T'HOOG. Cet auteur, aseptisant des œufs de *Drosophile* avec un mélange d'alcool et de chloramine, les transporte sur un milieu artificiel stérilisé par la chaleur et comprenant un mélange salin, de la gélose, du saccharose, de la peptone de caséine, un lipide (huile d'olive ou d'arachide, graisse de beurre) et de la levure. Selon VAN T'HOOG, l'autoclavage de la levure, qui détruit le facteur B 1, et l'irradiation, qui détruit le facteur B 2, supprimeraient l'activité de la levure et ren-

draient le régime artificiel inefficace. D'après mes propres résultats, j'aurais été tenté de supposer que l'autoclavage des milieux *in toto* provoquait sans doute quelque altération chimique ou physique du milieu nutritif, tout à fait indépendante de la présence du facteur B 1. Mais VAN T'HOOG déclare avoir pu compléter par l'aneurine les milieux autoclavés déficients. Ces résultats, dont je n'ai pris connaissance que longtemps après avoir entrepris mes propres recherches, m'ont amené à les reprendre à plusieurs reprises : l'autoclavage, même prolongé, de l'extrait de levure et de la peptone, ne nuit pas au développement larvaire ; la *Drosophile* n'exige pas de composés thermolabiles, et par conséquent pas d'aneurine. Mes résultats, ainsi d'ailleurs que ceux des autres auteurs, sont en contradiction formelle avec ceux de VAN T'HOOG. Peut-être cet auteur s'est-il trouvé en présence d'une souche présentant un pouvoir de synthèse moindre et des exigences alimentaires plus étendues.

LE FACTEUR B 2 (FLAVINE). — J'ai employé trois techniques distinctes et indépendantes pour priver de flavine mes milieux de culture : la destruction par irradiation à froid en milieu alcalin, l'adsorption par la franconite, l'élimination de la flavine par le phénol.

1°) L'extrait de levure et la solution de peptone de muscle, amenés à pH 8,6 par le carbonate de sodium, furent soumis durant 24 heures, en couche mince de 1 mm. d'épaisseur, à l'irradiation à courte distance (10 cm.) par la lampe de quartz ; les extraits irradiés furent ensuite neutralisés et se montrèrent aussi actifs que les extraits témoins.

2°) L'ensemble (solution de peptone + extrait de levure) fut traité durant 24 heures à pH 6,2, avec secouage continu, par un poids de franconite égal au 1/4 du liquide traité (1). J'éliminai la franconite des solutions par centrifugation ; l'adsorption de la flavine par la franconite ne fit pas disparaître l'activité des extraits.

3°) J'eus recours également à une propriété de la flavine, récemment signalée par GREENE et BLACK [11]. La flavine est très inégalement soluble dans l'eau et le phénol ; un extrait

(1) La franconite est une terre adsorbante qui adsorbe particulièrement la flavine ; elle avait été déjà employée par RANDOIN et RAFFY pour débarrasser de facteur B₂ des extraits de levure destinés à l'alimentation du Rat.

aqueux, neutre ou acide, contenant de la flavine, et mis en contact avec le phénol, lui livre presque intégralement sa flavine (1). Je secouai dans un entonnoir à décantation l'extrait aqueux de levure et une solution de phénol à 90 p. 100 ; il se forma d'abord une émulsion, qui se sépara lentement en deux phases, phénolique et aqueuse. En traitant plusieurs fois la phase aqueuse par le phénol, comme précédemment, j'arrivai à la débarrasser pratiquement de toute la flavine. Je rassemblai alors d'une part, l'ensemble des phases phénoliques, d'autre part la phase aqueuse. Je traitai les unes et les autres par l'éther, qui est un solvant électif du phénol et qui sépare ce composé de l'eau. Je récupérai ainsi 1°) à partir de la phase aqueuse, un extrait, entièrement débarrassé de toute trace de phénol, et que nous désignerons sous le nom d' « extrait aqueux » ; (cet extrait était exempt de flavine et aussi, comme l'ont montré GREENE et BLACK dans un travail antérieur [10], exempt d'aneurine, car l'aneurine, comme la flavine, passe de préférence dans la phase phénolique) 2°) à partir des phases phénoliques, un extrait aqueux, débarrassé de phénol comme le précédent, mais que nous désignerons vu son origine, sous le nom d' « extrait phénolique » (cet extrait contenait la flavine et l'aneurine). Les deux types d'extraits se montrèrent également actifs, avec peut-être une légère supériorité pour l' « extrait aqueux », exempt de flavine et d'aneurine. Les composés nécessaires à la *Drosophile* n'ont donc pas les mêmes coefficients de partage entre l'eau et le phénol que les facteurs B 1 et B 2.

Ces diverses expériences d'élimination de la flavine furent répétées 3 fois dans le cas de l'irradiation ultra-violette, 5 fois dans le cas de l'adsorption par la franconite, 2 fois dans le cas du partage entre le phénol et l'eau, toujours avec des résultats concordants.

Dans tous les cas, j'ai vérifié sur une fraction aliquote de l'extrait de levure qu'il ne contenait plus de flavine. Pour cela j'ai évaporé à sec l'extrait de levure, et je l'ai repris par l'alcool méthylique à 50 p. 100. J'ai traité le filtrat méthylique par le permanganate de potassium, en milieu acétique, pour

$$(1) \text{ Le coefficient de partage à pH 7 est } \frac{\text{Phénol}}{\text{Eau}} = \frac{68}{1}, \text{ à pH 4, } \frac{\text{Phénol}}{\text{Eau}} =$$

$\frac{134}{1}$, pour une température de 25° C.

éliminer par oxydation les fluorescences parasites, selon la technique d'EEKELEN et EMMERIE, indiquée par GOUREVITCH [9], et j'ai constaté l'absence de fluorescence verte en lumière de Wood.

De l'ensemble de ces expériences, il ressort que la larve de *Drosophile* n'a pas besoin de flavine, ce qui n'est pas étonnant si l'on se rappelle que le régime alimentaire ne contient pas de glucides.

LA SOMME DES DIVERS FACTEURS B CHIMIQUEMENT ISOLÉS. — Un régime dans lequel figurent, pour 100 cm³ de milieu, l'aneurine (0 mg.,1) la flavine pure du foie (0 mg.,2), l'adénine (0 mg.,2), qui a été identifiée avec le facteur B 3, et l'inosite (0 mg.,2), qui a été reconnue comme un des constituants du « Bios », se montre insuffisant et n'assure pas la croissance larvaire : sur ce point, mes observations confirment et complètent certaines des conclusions de VAN T'HOOG : il existe donc un ou plusieurs composés, présents dans la Levure et indispensables à la *Drosophile*, qu'on ne peut identifier avec ceux des facteurs B qui ont été chimiquement isolés.

LE FACTEUR INSOLUBLE DE HOBSON [15]. — Cet auteur a reconnu, pour la mouche *Lucilia sericata* Meig., la nécessité d'un facteur de croissance, non soluble dans l'eau, qui se trouve dans la levure et le muscle de Bœuf ; la digestion libère ce facteur de sa combinaison insoluble et on le retrouve, à l'état soluble, dans les autolysats de levure et la peptone de muscle ; par contre il manque totalement dans le sang. En remplaçant la peptone de muscle par la peptone de fibrine, et en recourant à l'extrait de levure précédemment décrit, qui est un bouillon de levure non autolysée, j'ai éliminé ce facteur de mes milieux, qui ont été cependant capables d'assurer la croissance, la pupaison et la métamorphose. Le facteur insoluble de HOBSON n'est donc pas nécessaire à la *Drosophile*, soit qu'elle en effectue la synthèse, soit pour toute autre raison.

LA DROSOPHILE A-T-ELLE DES BESOINS SPÉCIAUX EN VITAMINES ?

On sait que l'œuf de Poule est pour les Mammifères un aliment complet. SCHEUNERT et WAGNER [33, 34] ont pu obtenir la croissance complète du jeune Rat, en le nourrissant exclusivement d'Œuf entier, qui contient donc toutes les vitamines nécessaires à la croissance. Or l'œuf de poule, aliment

complet pour les Vertébrés, ne contient pas les principes indispensables à la *Drosophile* : l'adjonction au milieu artificiel, à la place d'extrait de levure, soit d'extrait hydroalcoolique d'œuf, soit d'œuf entier lui-même (blanc + jaune), n'en améliore nullement la valeur. La *Drosophile* a donc des besoins en vitamines à la fois différents de ceux des vertébrés et plus stricts sous certains rapports : un aliment complet pour les Mammifères, ne l'est pas pour la mouche.

En résumé, la *Drosophile* paraît indifférente à 3, au moins, des facteurs connus pour les Vertébrés (A, B 1 et B 2), et, par contre elle exige un ou plusieurs composés non indispensables aux Vertébrés. Bien plus, dans un même ordre d'Insectes, les Diptères, on peut constater des différences de même ampleur : selon HOBSON, la mouche *Lucilia sericata* exigerait, outre le facteur insoluble que nous avons déjà mentionné, le facteur thermolabile B 1, et au moins deux facteurs thermostables, dont l'un est alcalinolabile.

2) Les propriétés des principes hydrosolubles inconnus, nécessaires à la croissance de la *Drosophile*.

Nous avons déjà vu qu'ils étaient thermostables. Ils présentent en outre les caractères suivants : grande solubilité dans l'eau et l'alcool à 70°, à chaud et à froid, très faible solubilité dans l'alcool absolu bouillant, insolubilité totale dans l'alcool absolu froid, l'acétone et les solvants neutres usuels (éther, chloroforme, toluène, éther de pétrole).

RÉSISTANCE AUX ALCALIS. — a) A froid : l'extrait de levure peut demeurer 24 heures à pH 9, en présence de CO_3Na_2 , 12 heures en présence d'un grand excès d'eau de baryte, sans perdre son activité ; (l'eau de baryte détermine un précipité inactif, les composé actifs demeurant en solution).

b) A chaud : les alcalis détruisent irréversiblement l'activité ; il suffit de 30 minutes d'autoclavage à 120° C., avec 5 p. 100 de CO_3Na_2 . L'un des constituants de l'indéterminé alimentaire est donc à la fois thermostable et alcalinolabile à haute température. On reconnaît là une double propriété du facteur B 2, et, en se fondant sur des faits de ce genre, HOBSON, par exemple, a conclu à la nécessité du facteur B 2 pour la *Lucilia*. Mais la supplémentation, soit par de la flavine de foie (de BYLA), soit par de l'extrait hydroalcoolique de

blanc d'œuf frais (très riche en flavine), d'extraits de levure dont l'activité a été détruite par les alcalis à chaud, ne rétablit pas cette activité. Le facteur alcalinolabile, bien qu'ayant cette propriété en commun avec les flavines, en est donc bien distinct.

ACTION DE L'HYDROLYSE ACIDE ET DES ADSORBANTS. — L'hydrolyse acide des extraits de levure, par SO_4H_2 à 5 p. 100, à 100° , pendant 5 heures, qui respecte les facteurs B 1 et B 2, diminue l'activité des extraits sur la croissance de la mouche et provoque un retard de croissance : la pupaison ne se produit que vers le 12-13^e jour, au lieu du 7^e. On aboutit au même résultat si, au lieu d'hydrolyser les extraits, on les agite avec divers adsorbants (noir animal, terre à foulon, silicate d'alumine anhydre). En augmentant la dose des extraits ainsi « affaiblis », on n'arrive pas à accélérer la croissance : il n'y avait donc pas eu destruction ou adsorption partielle d'un même principe indispensable. Plus probablement, il conviendrait de postuler l'existence de deux facteurs, l'un, indispensable, respecté par l'hydrolyse acide et les adsorbants, l'autre jouant un rôle auxiliaire d'accélérateur de la croissance, mais non indispensable, détruit par l'hydrolyse acide et retenu par les adsorbants. Les techniques classiques d'élution en milieu alcalin, soit à partir du silicate d'alumine (SEIDELL) soit à partir de la terre à foulon (OSBORNE et WAKEMAN), ne permettent pas de récupérer ce dernier facteur.

PURIFICATION DES EXTRAITS. — La fraction active des extraits de levure ne précipite pas par le sulfate neutre d'ammonium à saturation, ce qui permet d'éliminer la plupart des protides et des polypeptides que l'alcool à 70° n'aurait pas précipités. On peut aussi obtenir d'abondants précipités par l'acide phosphotungstique, le nitrate d'argent, l'acétate de zinc, tous agents classiques de précipitation des vitamines du groupe B ; mais ces divers agents détruisent complètement l'activité des extraits de levure sur la croissance de la *Drosophila* ; précipités et filtrats sont également inactifs. On obtient de meilleurs résultats avec l'acétate mercurique ; je me suis arrêté à la technique de purification suivante. L'extrait hydroalcoolique de levure, dont la préparation a été décrite plus haut (p. 122) est saturé de sulfate neutre d'ammonium, qui précipite une fraction inactive (polypeptides). On

filtre et l'on ajoute au filtrat aqueux de l'alcool, jusqu'à ce que le degré alcoolique atteigne 70, (on précipite ainsi une grande partie du sulfate d'ammonium, qui est beaucoup moins soluble dans l'alcool à 70° que dans l'eau). On filtre, on concentre au bain-marie pour chasser l'alcool, puis on ajuste à pH 6, avec de l'acide acétique, et on précipite par l'acétate mercurique, la fraction active. Le précipité, lavé avec une solution saturée d'acétate mercurique, est ensuite mis en suspension dans l'eau acidulée, puis traité par l'hydrogène sulfuré pour éliminer le mercure ; on élimine ensuite le sulfure de mercure par filtration, et on chasse l'hydrogène sulfuré du filtrat par ébullition.

L'extrait sec obtenu par évaporation est actif à la dose de 0,2 p. 100 du milieu artificiel total, ce qui est le signe d'une purification encore très imparfaite. Je n'ai pas poussé plus loin ces essais, qui m'eussent trop écarté de l'étude du besoin qualitatif d'azote ; ils m'ont cependant amené à entrevoir toute la complexité du problème et me permettent de conclure que les besoins de la *Drosophile* en vitamines paraissent à la fois, différents de ceux des Vertébrés et tout aussi complexes. De plus, la préparation d'extraits purifiés, abiurétiques, et ne contenant que très peu d'azote aminé, nous permet d'aborder avec plus de précision l'étude du besoin qualitatif d'azote.

CHAPITRE III.

LA NUTRITION AZOTÉE.

Dans toutes mes recherches sur la nutrition azotée, je me suis rapporté au régime — type suivant, qui assure entièrement la croissance larvaire (en 7 jours) suivie de pupaison (durant 6 jours) et aboutissant à des imagos normales, le tout à la température constante de $+ 26^{\circ}$ C.

Gélose	1 g.
« Nipagine sodée »	0 g.,5
Lécithine d'œuf	0 g.,5
Peptone pepsique de muscle de Bœuf (CHAPOTAUT) ..	2 g.
Solution saline	10 cm ³ .
Extrait hydroalcoolique de levure (OSBORNE et WAKEMAN) (apportant 0 g.,5 d'extrait sec)	10 cm ³ .
Eau distillée	Q. S. pour 100 cm ³ .

J'ai simplement fait varier l'aliment azoté, en prenant le régime précédent comme témoin.

1) Valeur alimentaire des produits de la dégradation complète des protides.

La question a été depuis longtemps posée, en ce qui concerne les Mammifères : l'hydrolyse diastasique, même complète, ne paraît pas altérer sensiblement l'efficacité des protides ; FRANK et SCHITTENHELM [8], opérant sur le lait écrémé et l'ovalbumine, étudient le produit de trois digestions successives (peptique, pancréatique, éreptique) et l'estiment équivalent aux protides originels, pour la nutrition du Rat. Dans le cas de la caséine, ABDERHALDEN et OPPLER [2] arrivent même à de meilleurs résultats avec les produits d'hydrolyse. Par contre l'éreptone serait légèrement inférieure à la viande, dont elle provient (mais peut-être la digestion a-t-elle détruit, en même temps que les chaînes peptidiques, des composés extractifs utiles).

L'hydrolyse acide, par contre, rend les protides inaptes à assurer l'entretien, car elle détruit complètement le tryptophane et partiellement la cystine. En supplémentant par le tryptophane les produits d'une hydrolyse acide totale de la caséine, HOPKINS [16] leur a restitué toute leur efficacité : la rupture des ponts entre les molécules d'acides aminés n'a donc pas d'importance et l'organisme des Mammifères effectue la synthèse de ses protides à partir d'acides aminés libres. Récemment MAC-COY, MEYER et ROSE [26] ont pu même obtenir la croissance complète du Rat avec un mélange artificiel d'acides aminés purs.

Par contre, on sait que le Cilié *Glaucoma piriformis*, étudié par LWOFF [24], ne peut se nourrir d'éreptone (1) et exige des polypeptides complexes.

J'ai voulu voir si la *Drosophile* était capable d'assimiler les produits de dégradation complète des protides, provenant d'une hydrolyse acide totale, et convenablement supplémentés en tryptophane et en cystine. La marche des expériences est la suivante : les peptones de muscle (peptone pepsique de CHAPOTEAUT) et de caséine (peptone pancréatique ROCHE) sont chacune soumise à l'hydrolyse sulfurique, à l'autoclave : (Température + 120° C. Durée 5 heures. 500 cm³ de SO₄H₂ à 10 p. 100 pour 100 g. de peptone). Après refroidissement, dans les deux cas, l'acide sulfurique est éliminé aux trois quarts par la baryte hydratée, puis on filtre pour enlever le sulfate de baryum, et l'on lave soigneusement, à plusieurs reprises, à l'eau bouillante, le précipité barytique. Le filtrat et les eaux de lavage sont alors concentrés à faible volume, au bain-marie, puis débarrassés quantitativement, par l'eau de baryte, de tout l'acide sulfurique restant. On filtre et le filtrat est évaporé à sec. On obtient, dans les deux cas, une poudre brun pâle, dont la solution aqueuse est abiurétique et ne précipite pas par le réactif iodo-ioduré. Ce produit terminal peut être considéré comme entièrement dégradé et se composant uniquement d'acides aminés libres et de composés dits « extractifs ». Je l'ai employé, à la dose de 2 p. 100, à la place de la peptone correspondante, en ajoutant 0,05 p. 100 de tryptophane et 0,05 p. 100 de cystine. Ce dernier composé est très peu soluble, même à chaud : je l'ai introduit juste avant la solidification du milieu gélosé, dans lequel il est demeuré à

(1) Produit d'hydrolyse diastasique complète du muscle de Bœuf.

l'état de suspension stable, extrêmement fine et pouvant être ingérée même par les plus petites larves.

Les résultats que j'ai obtenus avec les hydrolysats acides supplémentés sont un peu moins bons que ceux donnés par les peptones elles-mêmes (1), comme le montrent les chiffres ci-dessous. Mais on peut en conclure, avec certitude, que l'azote aminé, sous une forme entièrement dégradée, peut assurer l'entretien et la croissance de la larve de la *Drosophile*, avec pupaison et métamorphose, sans qu'il y ait lieu de fournir des polypeptides spécifiques. La *Drosophile*, à cet égard, se comporte donc comme les Mammifères.

PEPTONE DE MUSCLE. — Tube 161 : Pupes 65. Imagos 45 — Tube 162 : Pupes 70. Imagos 40 — Tube 163 : Pupes 30. Imagos 27 — Tube 164 : Pupes 49. Imagos 31 — Total : Pupes 214. Imagos 143.

HYDROLYSAT ACIDE DE PEPTONE DE MUSCLE (supplémenté en tryptophane et en cystine). : Tube 171 : Pupes 40. Imagos 30 — Tube 172 : Pupes 25. Imagos 15 — Tube 173 : Pupes 38. Imagos 25 — Tube 174 : Pupes 30. Imagos 22 Total : Pupes 133. Imagos 92.

PEPTONE DE CASÉINE. — Tube 183 : Pupes 58. Imagos 40 — Tube 184 : Pupes 54 Imagos 41 — Tube 185 : Pupes 49. Imagos 34 — Tube 186 : Pupes 39. Imagos 30 — Total : Pupes 200. Imagos 145.

HYDROLYSAT ACIDE DE PEPTONE DE CASÉINE (supplémenté comme le précédent) : Tube 192 : Pupes 33. Imagos 25 — Tube 193 : Pupes 36. Imagos 20 — Tube 194 : Pupes 18. Imagos 11 — Tube 195 : Pupes 26. Imagos 19 — Total : Pupes 113. Imagos 75.

Cinq expériences de ce type ont été effectuées, toujours avec des résultats concordants.

2) Existence de protides complets et de protides incomplets. Supplémentation.

Nous avons vu que les peptones de muscle, de caséine, et, comme nous l'avons indiqué au chapitre précédent, de fibrine, donnaient des résultats équivalents. C'est qu'elles con-

(1) Ces résultats peuvent être améliorés en faisant traverser à l'hydrolysât une couche de noir animal ; celui-ci adsorbe sans doute quelques produits nocifs dus à l'hydrolyse acide. En tout cas les hydrolysats ainsi clarifiés valent presque la peptone originelle.

tiennent, en proportions diverses, mais toujours suffisantes, les divers amino-acides indispensables à la *Drosophile*. Il n'en est pas de même pour tous les protides. Avec la peptone de soie ROCHE, j'ai obtenu des résultats beaucoup moins bons, bien qu'ils ne soient pas entièrement négatifs : Exemple : Tube 203 : Pupes 16. Imagos 8 — Tube 204 : Pupes 19. Imagos 11 — Tube 205 : Pupes 9. Imagos 5 — Tube 206 : Pupes 17. Imagos 14 — Total : Pupes 61. Imagos 38. Trois expériences successives m'ont donné les mêmes résultats médiocres.

Cette peptone de soie, qui est employée avec succès par les bactériologistes, dans la confection de nombreux milieux de culture, s'était montrée inefficace pour la nutrition du *Glaucoma piriformis*. Il s'agit exactement d'une peptone de sérine (protide qui constitue la gaine externe du fil de soie) ; la sérine a fait l'objet de plusieurs analyses partielles (ABDERHALDEN, ALDERS [3], TÜRK [36], peu concordantes. Il ressort cependant des anciens travaux d'ABDERHALDEN et de ceux, plus récents d'ALDERS [3], qu'elle ne livrerait, à l'hydrolyse, que de très faibles quantités d'histidine, de lysine et de phénylalanine. Elle présente donc sans doute plusieurs facteurs limitants et une tentative de supplémentation serait particulièrement complexe.

Certains protides, en particulier la gélatine et la zéine, fournis également à l'état de peptones, m'ont donné des résultats entièrement négatifs. Pour la gélatine, j'ai employé la peptone de gélatine de BYLA. Pour la zéine, introuvable dans le commerce, j'ai préparé et hydrolysé moi-même ce protide. J'ai extrait à froid, durant 24 heures, 500 g. de farine de maïs, par 5 litres d'alcool à 85°. J'ai concentré l'extrait alcoolique au 1/10^e du volume primitif, puis additionné le sirop ainsi obtenu de deux fois son volume d'éther. La zéine ayant précipité, je l'ai redissoute dans l'alcool à 85°, reprécipitée dans une grande quantité d'eau salée, séchée, lavée à l'éther et à l'alcool absolu, puis pulvérisée. Le rendement a été de 2 p. 100 environ. La zéine étant insoluble dans l'eau, je l'ai hydrolysée durant 3 heures, à + 120° C., par 5 volumes d'acide sulfurique à 5 p. 100. L'hydrolysât a été préparé comme les hydrolysats précédemment décrits des peptones de muscle et de caséine.

Dans les deux cas (gélatine et zéine) on n'obtient aucune

croissance : les petites larves filiformes, de 0 mm.,5 environ, survivent 5 à 6 jours après l'éclosion, sans croître, puis succombent, et noircissent rapidement.

Ce résultat négatif n'est pas dû à la toxicité des produits employés. Mélangés avec des protides complets, la peptone de gélatine et l'hydrolysât de zéine ci-dessus décrits se montrent efficaces. Nous retrouvons ici les phénomènes classiques de supplémentation, connus chez les Mammifères : je résumerai les résultats de ces expériences dans le bref tableau suivant (+ indique un résultat positif, — un résultat négatif, $\pm$ un résultat positif, mais avec un rendement médiocre).

SUPPLÉMENTATION

p. 100	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100
gélatine 2 —	caséine 2 +	muscle 2 +	fibrine 2 +	séricine 2 $\pm$
zéine 2 —	zéine 1 } $\pm$ muscle 1 }	zéine 1 } muscle 1 } + fibrine 1 }	gélatine 1 } + fibrine 1 }	séricine 1 } caséine 1 } +
muscle 1 $\pm$	caséine 1 $\pm$	gélatine 1 } zéine 1 } —	séricine 1 } muscle 1 } +	gélatine 1 } caséine 1 } +

3) Les acides aminés indispensables.

A la supplémentation par des protides complets, on peut substituer l'adjonction d'acides-amino purs : théoriquement, il suffit de fournir les amino-acides que nous savons être absents des protides incomplets ; pratiquement la méthode s'est montrée d'une application assez délicate.

a) LE TRYPTOPHANE.

Pour réaliser une carence en tryptophane, qui nous permette de conclure à la nécessité de cet acide aminé, nous disposons d'au moins 3 sources azotées distinctes, qui ne contiennent pas de tryptophane, et peuvent être rendues complètes sous tous les autres rapports, par supplémentation : 1°) les hydrolysats acides de protides, supplémentés en cystine, 2°) la gélatine, complétée pour toutes les autres déficiences qu'elle présente, 3°) la zéine, supplémentée en lysine.

1°) Les hydrolysats acides de peptones de muscle ou de caséine, supplémentés seulement en l(-) cystine (0,06 p. 100 du milieu total) n'assurent pas l'entretien ; la simple addition de l(-) tryptophane, à la même dose que la cystine, rend le milieu nutritif complet. Le contraste est très net entre les effets des deux régimes : en l'absence de tryptophane, des larves naines, mourant au bout d'une semaine environ ; sur les milieux supplémentés, de nombreuses larves de grande taille, dont un assez grand nombre (60 p. 100 environ) pupent et présentent ensuite une métamorphose normale.

2°) Le problème de la supplémentation de la gélatine, pour tous les acides aminés autres que le tryptophane, est assez complexe. La gélatine est également dépourvue de cystine et de tyrosine, et l'on n'est pas assuré qu'elle renferme de l'isoleucine en quantité suffisante (les auteurs s'étant généralement contentés de doser en bloc l'ensemble des trois leucines). De plus, depuis la découverte par ROSE d'un nouvel acide aminé indispensable, la thréonine (acide α amino. β hydroxy. n. butyrique), il importe de tenir compte de la teneur en thréonine de tout protide incomplet. Or, des expériences anciennes d'ELLIS et ROSE [7], il ressort que la gélatine ne contient pas de thréonine, ou en tout cas fort peu, puisqu'elle n'apporte aucune amélioration à un mélange artificiel, complet par ailleurs, mais dépourvu de cet acide aminé.

Pour apporter la thréonine, qui ne se trouve pas dans le commerce, j'ai traité par l'acide phosphotungstique en milieu sulfurique, pour en précipiter les acides diamminés, l'hydrolysate acide de caséine qui a été précédemment décrit. Sur le filtrat, qui contient l'ensemble des acides monoaminés, y compris la thréonine, je me suis débarrassé de l'acide phosphotungstique par la baryte, puis de l'excès de baryte par l'acide sulfurique, et j'ai évaporé à sec le filtrat terminal. La poudre blanche ainsi obtenue comprend l'ensemble des acides monoaminés de la caséine (thréonine incluse), à l'exception du tryptophane, détruit par l'hydrolyse acide. J'ai employé ce concentré, comme source de thréonine, dans toutes les expériences ultérieures où il m'a paru nécessaire d'introduire cet acide aminé. Je désignerai cette préparation sous le nom de « fraction monoaminée de la caséine ».

J'ai donc constitué l'aliment azoté comme suit : peptone de gélatine 2 p. 100 du milieu ; fraction monoaminée de la

caséine 0,5 p. 100 ; 1 (—) tyrosine 0,05 p. 100 ; 1 (—) cystine 0,05 p. 100 ; 1 (+) isoleucine 0,05 p. 100. Cet ensemble est aussi inefficace que les hydrolysats acides non supplémentés, et peut être complété par adjonction de tryptophane. L'aspect morphologique est le même que dans l'expérience précédente : d'une part de petites larves filiformes, d'autre part, et après un même laps de temps depuis le début de l'expérience, des imagos.

J'ai répété trois fois l'expérience de supplémentation des hydrolysats acides de protides, quatre fois l'expérience de supplémentation de la gélatine, toujours avec les mêmes résultats. On peut donc ici encore conclure à la nécessité du tryptophane pour la *Drosophile*.

3°) La zéine m'a donné des résultats assez inattendus : l'hydrolysât de zéine à 2 p. 100 du milieu, complété par du l. (—) tryptophane (0,05), de la l. (+) isoleucine (0,05), de la l. (+) lysine, sous forme de bichlorhydrate (0,09) et par la fraction monoaminée de la caséine apportant la thréonine (0,5), n'en acquiert pas plus d'efficacité et demeure incapable d'assurer la croissance larvaire. Ce n'est pas que l'hydrolysât de zéine soit toxique ou inassimilable, car, en mélange équipartite avec la peptone de muscle (1 p. 100 de chaque), il assure le développement de quelques larves ; il doit donc fournir un apport azoté utile. Sans doute la zéine présente-t-elle un facteur limitant autre que le tryptophane, la lysine, l'isoleucine et la thréonine, et dans ce cas la *Drosophile* aurait des exigences azotées plus strictes que celles des Mammifères : c'est la conclusion à laquelle nous arriverons d'ailleurs à la fin de ce chapitre.

b) LA CYSTINE.

La carence en cystine, comme la carence en tryptophane, peut être réalisée à l'aide d'hydrolysats acides et de peptone de gélatine. Il suffit de les compléter, non plus par de la cystine, mais par du tryptophane, pour avoir un régime complet sous tous les rapports, sauf quant à la cystine. J'ai donc constitué les régimes suivants : A) hydrolysât acide de caséine 2 p. 100, 1 (—) tryptophane 0,05. — A') mêmes constituants + 1 (—) cystine 0,05 — B) peptone de gélatine 2 p. 100, fraction monoaminée de la caséine 0,5, 1 (—) tryptophane 0,05, 1 (—)

tyrosine, 0,05 l (+) isoleucine 0,05 — B') mêmes constituants que B + l(—) cystine 0,05. Enfin j'ai aussi tiré parti de la faible teneur en cystine de la caséine, en peptonisant par l'acide sulfurique à 2 p. 100, à 100° C., pendant 5 heures, une caséine particulièrement purifiée (caséine extra-pure de HARRIS). La peptone de caséine ainsi obtenue est insuffisante, à la différence de la peptone commerciale courante, mais elle peut être également supplémentée, comme les régimes A et B, par adjonction de l(—) cystine.

Le tableau morphologique de la carence en cystine est assez différent de celui que nous offre la carence en tryptophane. Soit que la carence réalisée soit moins complète, soit que les effets s'en fassent sentir plus tard, on observe un début de croissance larvaire, aboutissant à des larves allongées et maigres. Une fraction assez importante de ces grandes larves (30 à 40 p. 100) se transforme en pupes. Mais la métamorphose est perturbée : les pupes, minces et recroquevillées, avortent le plus souvent. La cystine, comme le tryptophane, est donc indispensable à la *Drosophile*, bien que le besoin de cystine n'apparaisse pas aussi immédiat que le besoin de tryptophane et semble particulièrement considérable à la fin de la croissance larvaire.

c) LA LYSINE.

Pour obtenir une carence en lysine, chez les Mammifères, nous disposons des protides du groupe naturel des prolamines (zéine, gliadine). Ces protides sont insolubles et pour les incorporer de manière homogène à un milieu gélosé, il faut les solubiliser par l'hydrolyse. C'est ce que j'avais fait pour la zéine. On vient de voir que celle-ci ne constituait pas une source azotée favorable à l'étude du besoin qualitatif, car, outre le tryptophane et la lysine, dont nous la savons certainement dépourvue, outre la thréonine et l'isoleucine, dont il se peut qu'elle soit dépourvue, elle manque certainement d'un autre composé, inconnu de nous et indispensable à la *Drosophile*.

La gliadine du froment, dont j'ai décrit la préparation dans la première partie de ce travail, m'a donné les mêmes résultats négatifs. L'hydrolysât de gliadine, supplémenté en tryptophane, lysine, isoleucine et thréonine, s'avère aussi inefficace que celui de zéine ; le groupe des prolamines est proba-

blement dépourvu du composé inconnu dont les résultats précédents m'ont amené à postuler l'existence. Il devient donc très difficile de réaliser une carence en lysine, vu l'impossibilité d'utiliser les prolamines avec un supplément chimiquement défini.

Il convient cependant de faire les remarques suivantes :

1°) Les protides complets, qui assurent à la *Drosophile* un développement normal, sont tous riches en lysine (muscle, caséine, fibrine).

2°) L'adjonction de lysine à la sérécine, protide qui présente plusieurs facteurs limitants (dont probablement la lysine), améliore le rendement et double le nombre d'imagos produites par tube de culture.

3°) Si l'on emploie des mélanges, en proportions variables, de l'hydrolysât de zéine, complété comme nous l'avons indiqué précédemment, et de peptone de muscle, on obtient les résultats suivants :

a) hydrolysât de zéine complété, 1 p. 100 + peptone de muscle, 1 p. 100 — Moyenne de 22 imagos par tube.

b) hydrolysât de zéine complété, 1 p. 100 + peptone de muscle 0,5 p. 100 — Pas d'imagos.

c) hydrolysât de zéine complété, 1 p. 100 + peptone de muscle, 0,5 p. 100 + bichlorhydrate de 1 (+) lysine, 0,15 p. 100 — Moyenne de 10 imagos par tube.

La lysine semble donc être nécessaire à la croissance de la *Drosophile* sans qu'il soit possible de l'affirmer catégoriquement, comme pour le tryptophane et la cystine.

d) L'ARGININE ET L'HISTIDINE.

Ces acides aminés, qui se trouvent dans tous les protides naturels, font d'ordinaire l'objet d'une étude simultanée, car ils peuvent être éliminés ensemble des hydrolysats de protides, par la précipitation au sulfate d'argent.

Opérant sur un hydrolysât acide de caséine, selon la technique classique de KOSSEL et KUTSCHER [18], j'ai réduit à 1 p. 100 la concentration en acide sulfurique et j'ai étendu la solution jusqu'à ce qu'il y eût 800 cm³ de solution pour 50 g. de protide originel. J'ai alors porté la solution au bain-marie à 35° C. et je l'ai mise en contact avec une bouillie d'oxyde d'argent et d'acide sulfurique dilué, préparée au moment-

même, et que j'ai ajoutée par petites fractions, en remuant constamment. J'ai prélevé de temps en temps un peu du liquide surnageant, et, après l'avoir filtré, j'en ai versé une goutte sur un verre de montre placé sur fond noir et contenant un peu d'eau de baryte. Dès que cet essai m'a donné un précipité de couleur beige, j'ai arrêté le traitement argentique. J'ai refroidi l'ensemble, puis ajouté une solution de baryte, préalablement saturée à chaud, jusqu'à ce que le milieu eût une réaction nettement alcaline. J'ai ensuite éliminé par filtration à la trompe le précipité argentico-barytique d'arginine et d'histidine. Après avoir acidifié le filtrat par l'acide sulfurique, je l'ai traité par l'hydrogène sulfuré pour éliminer l'argent. Après filtration du sulfure d'argent, j'ai chassé par ébullition l'hydrogène sulfuré du filtrat, que j'ai ensuite neutralisé exactement, puis évaporé à sec.

Le produit obtenu contenait sans doute encore un peu d'arginine et d'histidine, car la technique de KOSSEL et KUTSCHER ne permet pas d'éliminer quantitativement ces acides aminés. Tel quel, il m'a cependant permis, après addition de tryptophane et de cystine (qui avaient été détruits par l'hydrolyse acide) de réaliser une carence spécifique, portant sur l'arginine et l'histidine.

On observe, comme dans le cas de la carence en cystine, un début de croissance larvaire, mais s'arrêtant plus tôt : en effet, les larves privées d'arginine et d'histidine demeurent longues et grêles et ne se transforment pas en pupes. L'addition d'arginine seule ou d'histidine seule, à la dose de 0,05 p. 100 du milieu total, ne modifie rien. Par contre, l'addition simultanée de ces deux composés améliore considérablement le régime alimentaire : on obtient de nombreuses pupes et, dans quelques cas seulement, des imagos (environ 5 p. 100 des pupes). De ces expériences, qui ont été répétées quatre fois, avec des résultats identiques, on peut conclure : 1°) que l'arginine et l'histidine sont sans doute indispensables toutes deux à la formation du corps gras et à l'évolution normale de la larve qui conduit à la pupaison (1). 2°) que le traitement argentique a précipité ou détruit quelque composé, acide aminé ou autre, dont la présence dans le régime paraît particulièrement utile à l'évolution normale de la métamor-

(1) Rappelons que, d'après les travaux récents, l'histidine seule semblerait nécessaire pour les Mammifères.

phose. Par ailleurs, les hydrolysats traités selon la technique de KOSSEL et KUTSCHER ne sont nullement toxiques : complétés par de l'arginine et de l'histidine, et joints en mélange équipartite à la peptone de caséine originelle, ils assurent la croissance complète de la larve, suivie de la pupaison et de la métamorphose.

Résumant l'ensemble des faits précédents, nous pouvons affirmer ceci :

A) Le tryptophane et la cystine sont certainement indispensables à la *Drosophile*, le tryptophane de manière immédiate, son absence empêchant toute croissance et entraînant rapidement la mort des larves, la cystine de façon plus tardive, les effets de la carence en cystine sur la larve se faisant surtout sentir ultérieurement, sur la métamorphose, qui n'aboutit généralement pas.

B) La lysine, l'arginine et l'histidine sont très probablement indispensables, ces deux derniers amino-acides étant indispensables à la larve pour la pupaison.

C) Un composé indispensable, autre que la thréonine, et inconnu de nous, manquerait dans les protides du groupe des prolamines (gliadine, zéine).

4) L'inefficacité des mélanges artificiels d'acides aminés.

Depuis la découverte de la thréonine, l'emploi des mélanges artificiels d'acides aminés comme unique source d'azote protéique a permis de préciser l'étude du besoin qualitatif d'azote, tout au moins chez le Rat. Le procédé usuel consiste à préparer un mélange artificiel contenant tous les acides aminés connus, sauf un. Par ce moyen, ROSE et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence le caractère indispensable de la phénylalanine, de la leucine, de l'isoleucine, de l'histidine, et au contraire, le caractère contingent de la tyrosine, de la norleucine, de l'arginine, etc... J'ai naturellement songé à utiliser ce procédé pour l'étude de la nutrition azotée de la *Drosophile* : c'était le seul moyen que j'eusse d'instituer des carences en phénylalanine, leucine, isoleucine, amino-acides qui se trouvent dans toutes les protides et qu'il est très difficile d'éliminer des hydrolysats.

J'ai employé un mélange artificiel de 18 acides aminés, supplémenté par la fraction monoaminée de l'hydrolysat de

caséine, qui apporte la thréonine. J'ai constamment échoué dans cette tentative, qu'elles qu'aient été les proportions des divers amino-acides. Je résumerai brièvement ces essais :

Un premier mélange (C), qui rappelle la composition de la caséine, est constitué comme suit : glycine 10 mg. ; l (+) alanine 40 mg. ; l (+) valine 150 mg. ; l (—) leucine 150 mg. ; l (+) isoleucine 150 mg. ; l (—) proline 150 mg. ; l (—) phénylalanine 80 mg. ; l (—) tyrosine 90 mg. ; acide l (+) glutamique 430 mg. ; acide l (—) aspartique 80 mg. ; l (—) sérine 10 mg. ; l (—) cystine 25 mg. ; cystéine 25 mg. ; méthionine 50 mg. ; l (—) histidine (monochlorhydrate) 70 mg. ; l (+) arginine (carbonate) 120 mg. ; l (+) lysine (bichlorhydrate) 230 mg. ; l (—) tryptophane 45 mg. ; bicarbonate de sodium 20 mg. ; fraction monoaminée de la caséine 500 mg. Total : 2 g.,425 pour 100 cm³ de milieu artificiel. (Celui-ci comprend, en outre, les constituants habituels, gélouse, lécithine, « Nipagine », solution saline, extrait de levure).

Ce milieu, pourtant très complexe, fournit des résultats entièrement négatifs : on n'obtient même pas un début de croissance et les larves succombent 3 ou 4 jours après l'éclosion. Que conclure d'un tel résultat ? Le mélange artificiel apporte, outre les 18 amino-acides introduits individuellement, la thréonine, l'hydroxyproline, et l'acide hydroxyglutamique, contenus dans la « fraction monoaminée de la caséine ». Un mélange semblable, fourni au Rat, assure une croissance normale (ROSE). Faut-il en inférer que la *Drosophile* a des exigences plus strictes que celles des Mammifères ? Avant de me rallier à cette conclusion, j'ai envisagé diverses hypothèses.

a) Tout d'abord, le mélange artificiel pouvait être toxique pour la mouche : j'ai constitué un régime mixte (mélange artificiel (C) 1 p. 100, peptone de muscle 2 p. 100), qui m'a donné d'excellents résultats. L'adjonction du mélange artificiel à un milieu déjà satisfaisant n'en modifie pas la valeur, ce qui témoigne de l'innocuité du mélange.

b) Le mélange aurait pu n'être que partiellement assimilé, certains de ses constituants étant très peu solubles à froid. J'ai répété mes premières expériences en dissolvant tous les constituants du mélange artificiel dans l'eau bouillante ; (seules la tyrosine et la cystine demeurent insolubles). Dans ce cas, un certain nombre d'acides-amino précipitent par refroidissement.

dissement, mais en formant une suspension extrêmement fine, répartie également dans tout le milieu gélosé, et que même les plus petites larves peuvent ingérer. Le mélange artificiel ainsi homogénéisé n'en est pas devenu meilleur. D'ailleurs le fait suivant montre bien que le mélange d'acides aminés est assimilable et que, s'il ne donne pas de résultats satisfaisants, c'est par suite de l'absence d'un composé indispensable : un milieu où se trouvent en quantités égales (1 p. 100 chaque) le mélange artificiel (C) et la peptone de muscle, donne des résultats supérieurs (moyenne de 25 imagos par tube de culture) à ceux-(moyenne de 10 imagos par tube) que donne un milieu contenant seulement 1 p. 100 de peptone de muscle. Le mélange artificiel joue donc un rôle indéniable de supplément azoté.

c) Enfin, le mélange d'acides aminés pouvait être mal équilibré. J'en ai constitué plusieurs autres, en proportions variées, rappelant tantôt la composition des protides du muscle (mélange D), tantôt celle de la fibrine (mélange E), parfois même constitués par un mélange en quantités égales des 18 acides aminés (mélange F). Tous m'ont donné le même résultat négatif : j'étais donc amené à postuler l'existence d'un composé indispensable, absent des mélanges. Restait à s'enquérir de la nature de ce composé.

5) La *Drosophile* a-t-elle besoin de composés extractifs ?

On désigne d'ordinaire, sous ce nom, les composés azotés très hydrosolubles, non protéiques, et souvent mal définis au point de vue chimique, qui sont généralement mêlés aux peptones commerciales. Dans le cas du muscle, cet extractif est connu avec assez de précision (1). Quant à la fibrine et à la caséine, elles peuvent être accompagnées, soit d'impuretés dues à une préparation trop grossière de la matière première, soit de composés qui se sont formés au cours de l'hydrolyse. Ces diverses substances, comme l'ensemble de l'extractif musculaire, auraient pour communs caractères d'être hydrosolubles et non protéiques, et l'une d'entre elles pourrait être indispensable à la *Drosophile*. En tout cas, cette substance manque évidemment dans le mélange artificiel d'amino-acides

(1) Citons par exemple la créatine, la créatinine, la carnine (hypoxanthine-inosine), la carnosine (β -alanyl-histidine), l'inosite, etc...

purs ; quant à la « fraction monoaminée de la caséine » qui apporte la thréonine, les divers traitements qu'elle a subis (précipitation des acides diamminés par l'acide phosphotungstique, précipitation des acides phosphotungstique et sulfurique par la baryte) peuvent en avoir éliminé, en cours d'opération, les composés extractifs qui s'y trouvaient mêlés. Je me suis donc attaché en premier lieu à résoudre cette question : les composés qui manquent à mon mélange artificiel font-ils partie de l'extractif ?

Pour cela j'ai employé deux méthodes convergentes *a)* supplémentation, par l'extractif, de mélanges artificiels inefficaces ; *b)* élimination de l'extractif des protides naturels efficaces.

a) Le mélange artificiel (C), supplémenté par de l'extrait sec de bouillon de viande (à des doses variant de 0,02 à 0,5 p. 100) ne s'en trouve nullement amélioré ; on observe toujours le même tableau : mort rapide des jeunes larves, sans croissance.

b) Les protides naturels privés de leur extractif conservent leur efficacité. Pour m'en assurer j'ai eu recours à deux procédés.

— D'une part, j'ai traité la peptone de muscle sèche par l'alcool à 90° froid, qui en dissout la plus grande partie ; la plupart des composés extractifs par contre (créatine-crétinine) sont très peu solubles dans l'alcool à 90°. Le filtrat alcoolique, débarrassé d'alcool par ébullition, se montre aussi efficace que la peptone elle-même.

— D'autre part, j'ai saturé par le sulfate neutre d'ammonium, une solution aqueuse, à 10 p. 100, de peptone pepsique de muscle, précipitant ainsi une fraction importante P, constituée par des polypeptides, tandis que les divers composés extractifs et les amino-acides libres restent en solution. J'ai lavé soigneusement le précipité avec une solution saturée de sulfate d'ammonium, et je l'ai redissous dans un peu d'eau. J'ai répété deux fois la précipitation au sulfate d'ammonium et le lavage. La fraction polypeptidique P, ainsi obtenue, qu'on peut estimer entièrement débarrassée de l'extractif, se montre aussi efficace que la peptone initiale et permet d'obtenir de nombreuses imagos.

Il semble donc bien établi 1° que les composés constituant « l'extractif » ne sont pas indispensables à la croissance de

la *Drosophile*, 2° que les composés dont l'absence rend inefficaces les mélanges artificiels, doivent faire partie de la molécule protéique.

6) Existence probable d'un indéterminé alimentaire de nature protéique.

Nous sommes ainsi amenés à supposer l'existence, dans les protides usuels (caséine, fibrine, muscle), d'un acide aminé inconnu, indispensable à la croissance de la *Drosophile*, mais non à celle des Mammifères. Une telle hypothèse qui, naguère, eût paru peu vraisemblable, devient plus plausible à la lumière des découvertes récentes : des composés indispensables, tels que la méthionine, la thréonine, dont l'existence même était insoupçonnée il y a peu de temps, ont été retrouvés dans la molécule de nombreux protides. Résumons brièvement les faits qui plaident en faveur de cette hypothèse.

a) Les mélanges artificiels d'acides aminés, supplémentés en thréonine, qui constituent pour le Rat un aliment azoté complet, sont insuffisants pour la *Drosophile*.

b) Par contre, les hydrolysats acides de divers protides (muscle, caséine) complétés en tryptophane et en cystine, assurent à la *Drosophile* une croissance normale.

c) Le corps indispensable, présent dans les hydrolysats et absent des mélanges artificiels, n'appartient pas à l'« extractif ».

d) Les mélanges artificiels d'acides aminés peuvent être efficacement supplémentés par la fraction polypeptidique de la peptone de muscle (fraction précipitée par le sulfate neutre d'ammonium à saturation). En mélangeant en quantités égales (1 p. 100 chaque) cette fraction et le mélange artificiel (C) d'acides aminés, on obtient un aliment azoté complet.

e) Cet effet de supplémentation peut être également observé dans des cas où, après avoir remédié à toutes les déficiences connues, je n'avais obtenu que des résultats négatifs.

1. C'est le cas de l'hydrolysate de zéine, que l'adjonction d'un supplément complexe (tryptophane, cystine, lysine, isoleucine, et fraction monoaminée de la caséine apportant la thréonine) ne rend pas efficace. Par contre un mélange, par parties égales, de l'hydrolysate de zéine ainsi complété, et de

la fraction polypeptidique de la peptone de muscle, qui a été précédemment décrite, assure une croissance complète de la larve de *Drosophile*, suivie de pupaison, puis de métamorphose.

2. Le même résultat s'observe avec la « fraction monoaminée de la caséine », que j'employais comme source de thréonine, et qui se compose de tous les acides aminés non précipités par l'acide phosphotungstique. Ce mélange n'est nullement amélioré par l'adjonction simultanée de tous les amino-acides dont nous le savons dépourvu : tryptophane et cystine, détruits par l'hydrolyse acide, tyrosine, précipitée au cours de la neutralisation, bases hexoniques ((arginine, histidine, lysine) précipitées par l'acide phosphotungstique. Ici aussi, l'adjonction à cet ensemble inefficace, d'une égale quantité de la fraction polypeptidique (P) de la peptone de muscle, rend efficace l'aliment azoté.

f) Cette fraction de la peptone de muscle conserve ses propriétés, même après hydrolyse sulfurique : l'effet de supplémentation qu'elle exerce est donc dû, très vraisemblablement, à la présence d'un acide aminé.

Une tentative pour déterminer la nature de celui-ci m'eût engagé dans une très longue et difficile étude ; aussi me contenterai-je des quelques indications suivantes :

1) Ce composé n'est présent ni dans les protides du groupe des prolamines (zéine, gliadine), ni dans la fraction de l'hydrolysât de caséine qui reste en solution en présence d'acide phosphotungstique. Dans ce dernier cas, il a donc été précipité avec les acides diaminés, sans qu'on puisse en conclure qu'il s'agit d'un acide diaminé, car nombreux sont les composés de toute nature précipités par l'acide phosphotungstique.

2) Ce composé n'est sans doute présent, dans les protides complets, qu'à un taux assez faible : en effet, pour obtenir un effet de supplémentation, avec la fraction polypeptidique de la peptone de muscle, ci-dessus décrite, il faut en ajouter une quantité importante (quantité de supplément égale à la quantité de l'aliment déficient).

3) Après avoir séparé de l'extractif et des amino-acides libres, en la précipitant par le sulfate d'ammonium à saturation, la fraction active de la peptone de muscle, je l'ai soumise à l'hydrolyse sulfurique jusqu'à dégradation totale. J'ai

traité l'hydrolysât abiurétique par le sulfate mercurique, qui précipite les acides aminés du groupe de l'histidine. Ce n'est pas parmi eux qu'il faut rechercher le composé indispensable, car la fraction de l'hydrolysât précipitée par le sulfate mercurique n'exerce aucun effet de supplémentation sur les mélanges artificiels inefficaces ; le composé indispensable se trouve dans le filtrat, qui contient tous les autres acides aminés.

Dans l'ensemble, on peut tirer des résultats expérimentaux relatés dans ce chapitre la conclusion suivante : le besoin qualitatif d'azote présente les mêmes caractères généraux chez la *Drosophile* que chez les Mammifères : le pouvoir de synthèse azotée paraît même encore plus réduit chez cet Insecte, qui exige pour sa croissance, au moins une substance (probablement un acide aminé) non indispensable à la croissance des Mammifères.

CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE.

Le présent travail, consacré à l'analyse qualitative du besoin d'azote chez un Insecte, est une étude comparée de la valeur alimentaire de divers milieux artificiels (stérilisés chimiquement), effectuée en prenant, pour réactif biologique, la croissance entière de la *Drosophile*, de l'œuf à l'imago.

I. La nécessité d'introduire dans les milieux artificiels un indéterminé alimentaire, m'a amené tout d'abord à préciser les besoins de la *Drosophile* en vitamines.

1. Les facteurs A, B1, B2, ne paraissent pas nécessaires à cet insecte.

2. Par contre, il exige pour sa croissance des composés hydrosolubles, présents dans la levure, et non indispensables aux Mammifères, composés dont j'ai précisé quelques propriétés physiques et chimiques.

3. Cette étude m'a permis de purifier les extraits de levure et de les débarrasser des protides : elle constitue donc une préface nécessaire à l'étude de la nutrition azotée.

II. Après avoir ainsi précisé la composition des milieux artificiels, je suis parvenu aux conclusions suivantes, relatives au besoin qualitatif d'azote :

1. La *Drosophile*, comme les Mammifères, est capable d'assimiler les protides complètement dégradés en leurs amino-acides.

2. Tandis que certains protides (muscle, caséine, fibrine) assurent une croissance normale, d'autres (séricine) donnent un rendement très médiocre, d'autres enfin (gélatine, zéine) sont totalement inefficaces : les protides déficients peuvent être supplémentés par les protides complets, comme on le fait pour les Mammifères.

3. Le tryptophane et la cystine sont certainement indispensables à la *Drosophile* ; la lysine, l'arginine et l'histidine le sont aussi très vraisemblablement.

4. Des mélanges artificiels, comprenant 18 acides aminés et complétés par un concentré de thréonine, sont absolument inefficaces ; cette inefficacité n'est pas due à l'absence de composés extractifs.

5. Les divers protides complets pour la *Drosophile* doivent tous contenir un composé inconnu, indispensable à la croissance de cet Insecte, mais non à celle des Mammifères, et qui doit être vraisemblablement un acide aminé.

III. Le besoin qualitatif d'azote est donc très complexe, plus encore que celui des Mammifères : un tel résultat ne doit pas être généralisé à l'ensemble des Insectes, dont le régime est varié à l'infini ; le faible pouvoir de synthèse azotée de la *Drosophile* doit être en rapport avec l'extrême complexité chimique des levures, qui forment l'aliment naturel de cet Insecte. En tout cas l'ensemble des faits précédents doit nous inciter à de nouvelles recherches, portant sur des groupes animaux très variés.

BIBLIOGRAPHIE DE LA DEUXIÈME PARTIE.

1. ABDERHALDEN. — Beitrag zur kenntnis der synthetischen Leistungen des tierischen Organismus. *Ztschr. Physiol. Chem.*, 1925, **142**, 189.
2. ABDERHALDEN und OPPLER. — Weiterer Beitrag zur Frage der Verwertung von tief abgebautem Eiweiss im Organismus des Hundes. *Ztschr. Physiol. Chem.*, 1907, **51**, 226.
3. ALDERS. — Beitrag zur kenntnis des Seidenleims. *Biochem. Ztschr.*, 1927, **183**, 446.
4. BACOT and HARDEN. — Vitamin requirements of *Drosophila* : I. Vitamins B and C. *Biochem. Journ.*, 1922, **16**, 148.
5. BAUMBERGER. — A nutritional study of insects, with special reference to microorganisms and their substrate. *Journ. Exp. Zool.*, 1919, **28**, 1.
6. BERTRAND et NAKAMURA. — Sur un nouveau cas de mutation physiologique chez la Souris. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, **7**, 708.
- 6 bis. CHAPMAN. — Nutritional studies on the confused flour beetle. *Tribolium confusum* Duval. *Journ. Gener. Physiol.*, 1924, **6**, 565.
7. ELLIS and ROSE. — Feeding experiments with mixtures of highly purified amino-acids. II. The supplementing effect of protein. *Journ. Biol. Chem.*, 1931, **94**, 167.
8. FRANK und SCHITTENHELM. — Zur Kenntnis des Eiweiss Stoffwechsels *Ztschr. Physiol. Chem.*, 1911, **73**, 157.
9. GOUREVITCH. — La distribution de la flavine dans les tissus des Mammifères en relation avec leur respiration résiduelle. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 527.
10. GREENE and BLACK. — Crystalline Vitamin B 1 from natural sources. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1937, **59**, 1395.
11. GREENE and BLACK. — The preparation of pure d. riboflavin from natural sources. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1937, **59**, 1820.
12. GUDERNATSCH and HOFFMAN. — A study of the physiological value of amino-acids during the early periods of growth and differenciation. *Arch. f. Entwickel Mech.*, 1936, **135**, 136.
13. GUYÉNOT. — Recherches expérimentales sur la vie aseptique et le développement d'un organisme (*Drosophila ampelophila*) en fonction du milieu. *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, 1917, **51**, 1.
14. HENRIQUES. — Die Eiweiss Synthese im tierischen Organismus. *Ztschr. Physiol., Chem.* 1908, **54**, 406.
15. HOBSON. — Growth of blow-fly larvae on blood and serum : I. Response of aseptic larvae to vitamin B. *Biochem. Journ.* 1933, **27-2**, 1899.

16. HOPKINS. — Newer standpoints in the study of nutrition. *Journ. Chem. Soc.*, 1916, **109**, 629.
17. HOSKINS and CRAIG. — Recent progress in insect physiology. *Physiol. Reviews.*, 1935, **15-4**, 525.
18. KOSSEL und KUTSCHER. — Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. *Ztschr. Physiol. Chem.*, **31**, 165.
19. LAFON. — Les facteurs liposolubles nécessaires à la croissance de *Drosophila melanogaster* Meig. *C. R. Soc. biol.*, 1937, **124**, 798.
20. LAFON. — Les facteurs hydrosolubles nécessaires à la croissance de *Drosophila melanogaster* Meig. *C. R. Soc. de biol.*, 1937, **124**, 800.
21. LAFON. — Le besoin qualitatif d'azote chez *Drosophila melanogaster* Meig. *C. R. Acad. Sc.*, 1938, **207**, 306.
22. L'HÉRITIER. — Etude de variations quantitatives au sein d'une espèce *Drosophila melanogaster* Meig. *Arch. Zool. Exp. et Gén.*, 1937, **78-8**, 255.
23. LOEB. — The simplest constituents required for growth and the completion of the life cycle of an insect (*Drosophila*). *Science*, 1915, **41**, 169.
24. LWOFF. — Recherches biochimiques sur la nutrition des protozoaires : le pouvoir de synthèse. *Thèse Sciences Paris* 1932, (Monographies de l'Institut Pasteur).
25. MAC CAY. — An insect test for vitamin B fractions. *Journ. Biol. Chem.*, 1933, **100**, 67.
26. MAC-COY, C. MEYER, and W. C. ROSE. — Isolation and identification of a new essential amino-acid. *Journ. Biol. Chem.*, 1935, **112**, 283.
27. MICHELbacher, HOSKINS and HERMS. — The nutrition of flesh-fly larvae (*Lucilia sericata* Meig.). I. The adequacy of sterile synthetic diets. *Journ. Exp. Zool.*, 1933, **64**, 109.
28. OSBORNE and WAKEMAN. — Extraction and concentration of the water-soluble vitamin from brewer's yeast. *Journ. Biol. Chem.*, 1919, **40**, 383.
29. PEARL, ALLEN and PENNIMAN. — Culture media for *Drosophila*. II. A new synthetic medium and its influence on fertility at different densities of population. *Amer. Naturalist.*, 1926, **60**, 357.
30. PINCHERLE. — Experimenti di orientamento e primi risultati sull'alimentazione di larve di anfibio con vari latt. *Atti. Acad. Fisiocrit. Siena*, 1925, **17**, 193.
31. PINCHERLE. — Alimentazione di larve di *Bufo vulgaris* con siero di latte, lattalbumina, albumine varie, peptone, e amino-acidi. *Atti Acad. Fisiocrit. Siena*, 1928, **3**, 781.
32. RANDOIN, RAFFY et AGUIRREZABALA. — Préparation d'un régime artificiel exclusivement privé de vitamine B2, et destiné au Rat en voie de croissance. *C. R. Soc. biol.*, 1937, **126**, 872.
33. SCHEUNERT und WAGNER. — Ueber den Einfluss des Kochens auf den Nährwert des Hühnereies. *Deutsch. Med. Woch.*, 1927, **53**, 1258.
34. SCHEUNERT und WAGNER. — Ueber den Nährwert von rohem und gekochtem Eidotter. *Deutsch. Med. Woch.*, 1929, 395.

35. SWEETMAN and LEROY PALMER. — Insects as test animals in vitamin research. I. Vitamin requirements of the flour-beetle, *Tribolium confusum* Duv. *Journ. Biol. Chem.*, 1928, **77**, 33.
 36. TÜRK. — Ueber das Sericin und die quantitative Bestimmung seiner basischen Bestandteile. *Ztschr. Physiol. Chem.*, 1920, **111**, 70.
 37. UVAROV. — Insect Nutrition and Metabolism. *Transact. Entomol. Soc. of London*, 1929, **76-2**, 255.
 38. VAN T'HOOG. — Symbiontless cultures of *Drosophila* as a test-object on deficient food. *Acta brevia neerlandica*, 1935, **5**, 16.
 39. ZABINSKI. — Observations sur l'élevage des cafards nourris avec des aliments artificiels. *C. R. Soc. biol.*, 1926, **94**, 545.
 40. ZABINSKI. — Elevage des blattides soumis à une alimentation artificielle. *C. R. Soc. biol.*, 1928, **98**, 73.
 41. ZABINSKI. — Nouvelles recherches sur l'élevage des Blattides soumis à une alimentation artificielle. Influence de la composition du régime. *C. R. Soc. biol.*, 1938, **98**, 78.
-

RESUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Je résumerai ici l'essentiel de mes résultats, en m'efforçant de séparer les faits acquis des interprétations hypothétiques qui suivront au fur et à mesure leur exposé.



L'analyse physiologique du besoin de lysine et de cystine, effectuée sur le Rat et la Souris, constitue la première partie de ce travail.

I. Une première étude, de nature biométrique, consiste dans la comparaison des poids d'organes homologues, prélevés, les uns sur des animaux carencés, longtemps maintenus en équilibre, les autres sur des témoins beaucoup plus jeunes qui ont atteint naturellement le même poids.

Chez le Rat, la carence en lysine n'empêche pas une croissance partielle du cœur, des poumons, des reins, des testicules, de la rate, des glandes salivaires et des yeux. Par contre la musculature et le thymus régressent, ainsi que les ovaires. Le foie, le tube digestif, l'encéphale, l'hypophyse et les surrénales demeurent en équilibre.

Pour la Souris, les résultats sont assez différents : le cœur, les poumons, les glandes salivaires se maintiennent en équilibre, le foie augmente et la rate diminue de poids. Les reins, les testicules, les yeux et le thymus se comportent de même dans les deux espèces.

La carence en cystine fait également l'objet d'une étude, limitée au Rat : la privation de cystine n'empêche pas un accroissement partiel des reins, des testicules, des yeux et des glandes salivaires ; par contre, le thymus, le foie, la rate, l'hypophyse et les surrénales régressent, ou tout au moins ont leur croissance ralentie relativement à la croissance globale. Le cœur, les poumons, l'encéphale conservent leur rapport normal avec la masse totale de l'organisme.

Ni l'âge des animaux étudiés, ni le sexe (tout au moins en

ce qui concerne les organes somatiques) n'ont d'influence sur ces variations.

De plus, que la carence porte sur le Rat ou sur la Souris, qu'elle ait trait à la lysine ou à la cystine, certains organes (yeux, reins, testicules) s'accroissent aux dépens du reste de l'organisme ; le comportement des autres organes dépend de la nature de la carence et de l'espèce étudiée. Dans tous les cas, la constance du poids global n'est que la résultante de croissances partielles et antagonistes, affectant des territoires différents.

La persistance de ces croissances partielles chez les animaux carencés s'expliquerait, soit en considérant la lysine et la cystine plutôt comme des régulateurs de la croissance que comme des matériaux de la synthèse protéique, soit, avec plus de simplicité et de vraisemblance, en admettant d'importants transferts de ces acides aminés dans l'organisme.

II. L'étude de divers processus physiologiques aboutit aux conclusions suivantes, dont les trois premières sont valables pour les deux carences :

1° L'involution du thymus dépend uniquement de l'âge. Si l'on donne à des animaux carencés depuis longtemps et dont le thymus a presque complètement disparu, une alimentation mixte complète, ils peuvent croître à nouveau (sans thymus) et atteindre la taille adulte.

2° L'ossification est également liée à l'âge : tandis que les dimensions linéaires et le poids frais du squelette dépendent évidemment de la taille atteinte par l'animal, la déshydratation et la minéralisation de l'os, ainsi que la constitution de la réserve saline, s'effectuent en fonction du temps : l'os des animaux carencés est jeune quant à ses dimensions, vieux quant à sa composition. Cependant la persistance des cartilages de conjugaison rend possible en tout temps une reprise de la croissance.

3° Chez le mâle, les fonctions génitales s'instaurent et persistent en dépit des carences ; la spermatogénèse est normale ; les Rats carencés, accouplés à des femelles qui reçoivent une alimentation mixte ordinaire, engendrent des petits normaux, quant au nombre et à la taille.

4° Chez la femelle, il y a lieu de distinguer les résultats des deux carences :

a) *Carence en cystine.* — Chez la femelle adulte, elle ne fait disparaître ni le cycle ovarien (maturation et rupture du follicule, formation du corps jaune), ni la desquamation vaginale, qui en est le signe extérieur. Chez la femelle impubère, tantôt la carence empêche l'instauration de la fonction sexuelle (l'ovaire reste immature et le vagin ne se kératinise pas), tantôt elle n'y fait pas obstacle (et la kératinisation vaginale fait suite à la ponte ovulaire). L'un et l'autre cas s'observent, selon les individus, dans un ensemble d'animaux de même âge et de même souche.

On pourrait rendre compte de cette variabilité individuelle en admettant qu'une très faible quantité de cystine est nécessaire pour l'établissement du fonctionnement génital chez la femelle, et que le seuil nécessaire, variable d'un individu à l'autre, se trouve tantôt un peu supérieur, tantôt un peu inférieur, à l'apport de cystine, très réduit, mais inévitable, que fournit le régime artificiel.

b) *Carence en lysine.* — Chez la jeune femelle, la carence n'empêche pas la maturation de l'ovaire, pas plus qu'elle ne fait disparaître le cycle ovarien chez la femelle adulte. Par contre, la privation de lysine empêche l'apparition du cycle vaginal chez la jeune femelle et le fait cesser assez rapidement chez l'adulte. Il ressort de diverses expériences que la sensibilité de l'épithélium vaginal à la folliculine est nettement réduite par la carence en lysine.

De l'ensemble des résultats exposés aux paragraphes I et II, il serait assez légitime de conclure que, sous une apparence d'équilibre, le vieillissement des animaux carencés se poursuit, et que le maintien du poids global ne saurait être assimilé à un véritable entretien.

III. Aux observations biométriques et physiologiques sur l'état des animaux carencés en lysine ou en cystine succède une étude expérimentale, sur le même matériel, de l'action de diverses hormones.

1° Des injections répétées, soit d'hormone somatotrope antéhypophysaire, soit de thyroxine, ne provoquent, chez les ani-

maux carencés, aucun accroissement du poids global : il est donc vraisemblable que la lysine et la cystine, indépendamment de tout rôle fonctionnel, sont nécessaires à la synthèse protéique.

2° L'action des hormones se fait cependant sentir sur les tissus des animaux carencés, en stimulant la croissance de certains organes aux dépens du reste ; les résultats obtenus constituent une amplification expérimentale des phénomènes de croissance partielle observés au cours des carences.

a) *L'hormone somatotrope* stimule la croissance de la rate, des surrénales, du foie, des yeux, des pieds et des mains (acromégalie légère) ; elle entraîne une régression de l'hypophyse et du tractus génital femelle.

b) *La thyroxine* provoque, aux dépens de la musculature, l'hypertrophie de nombreux viscères (foie, rate, cœur, poumons, reins, testicules, surrénales) ; elle accélère la croissance et la déshydratation du squelette, ainsi que l'involution thyroïdienne.

c) *Les prolans* amènent une hypertrophie des organes génitaux des deux sexes, au détriment de l'ensemble des organes somatiques.

d) Les effets observés dépendent uniquement de la nature de l'hormone employée, que la carence ait trait à la lysine ou à la cystine.

Les animaux carencés ne présentent pas les symptômes classiques de l'insuffisance hypophysaire ou thyroïdienne, leurs tissus réagissent à l'hormone somatotrope et à la thyroxine, dans la mesure où l'action de ces hormones ne concerne pas l'accroissement du poids global ; enfin, l'action de ces hormones sur l'accroissement de la masse totale est inhibée par les carences : on pourrait donc penser, avec assez de vraisemblance 1° *que la lysine et la cystine interviennent dans la croissance comme matériaux* 2° *qu'elles n'ont sans doute pas de rapport direct avec les mécanismes humoraux de la croissance.*

IV. L'ensemble des recherches précédentes est complété par une étude sur les premières phases de la croissance (croissance intra-utérine et croissance du nourrisson). La carence, dans une étude de ce genre, porte sur la mère. L'observation

des effets indirects sur le fœtus ou le nourrisson confirme les conclusions précédentes sur le rôle essentiellement « constructeur » de la lysine et de la cystine.

1° *La gestation.*

a) Elle s'effectue normalement, en dépit des carences : la femelle gestante accroît même son poids global ; cette augmentation n'est d'ailleurs qu'apparente, car le fœtus est beaucoup moins riche que la mère en substance sèche, et plus particulièrement, en protides.

b) Une grossière esquisse du bilan de lysine et de cystine nous amène aux conclusions suivantes.

1. Il n'y a certainement pas lieu de supposer une synthèse de ces acides aminés dans l'organisme maternel.

2. Vu l'impossibilité d'éliminer totalement la lysine et la cystine des régimes artificiels, les emprunts que le fœtus doit faire aux tissus maternels ne sont pas très considérables.

3. Ces emprunts à la mère s'effectuent avec un rendement assez bon, mais très inférieur à l'unité.

2° *La croissance du nourrisson.*

a) Le nourrisson dépend uniquement du lait maternel et cela complique le problème des transferts, qui, au cours de la gestation, s'effectuaient directement par le placenta ; de plus, la teneur en protides de l'organisme croît continûment durant les premières semaines. Aussi les effets de la carence maternelle, relativement au poids frais total, se font-ils sentir plus sévèrement sur le nourrisson que sur le fœtus. La croissance, très lente durant les deux premières semaines, s'arrête : souvent le nourrisson, vers la fin de la troisième semaine est incapable de s'adapter à l'alimentation directe et meurt.

b) La mère diminue de poids au cours de l'allaitement ; encore moins que dans la gestation, il n'y a lieu de postuler une synthèse de lysine ou de cystine ; le transfert de ces amino-acides des tissus de la mère à ceux du nourrisson, doit même s'effectuer avec un rendement total assez médiocre.

c) Les carences en lysine et en cystine paraissent plutôt limiter la production du lait qu'en modifier la composition. Si

l'on ne laisse à la mère carencée qu'un seul nourrisson, il croît normalement, sans devenir obèse : il est donc probable qu'il mange à sa faim, tandis que des nourrissons plus nombreux doivent être victimes d'une inanition partielle. De plus, que la carence maternelle porte sur la lysine ou sur la cystine, les effets sont les mêmes sur la croissance relative des organes chez le nourrisson : il est donc vraisemblable qu'il s'agit, dans les deux cas, d'une même sous-alimentation quantitative, effet secondaire des deux carences.

d) L'étude biométrique des nourrissons de mère carencée fait voir dans tous les cas 1° que l'évolution morphogénétique et l'ossification s'effectuent uniquement en fonction du temps, tandis que le poids et la taille de la plupart des organes sont fonction du poids total de l'organisme 2° que la croissance rapide de l'encéphale, des yeux et des reins, et la déshydratation du système nerveux central dépendent à la fois de ces deux facteurs (âge et poids).

A la lumière des résultats de cette première partie, la lysine et la cystine paraissent surtout des matériaux passifs de la synthèse protéique ; leur absence du régime alimentaire ne semble perturber aucun mécanisme physiologique important.

Une description d'ensemble du besoin qualitatif d'azote chez un Insecte, la *Drosophile*, constitue la deuxième partie de ce travail.

I. Une technique originale de stérilisation des milieux de culture par un antiseptique, inoffensif pour la *Drosophile* et très actif contre les microorganismes, me permet d'opérer aseptiquement, en réduisant au minimum les précautions indispensables.

La nécessité d'introduire un indéterminé alimentaire dans les milieux artificiels m'amène d'abord à préciser la nature de cet indéterminé. Les facteurs A, B1, B2, que l'étude des animaux supérieurs nous a fait connaître, ne paraissent pas indispensables à la croissance larvaire de la *Drosophile* ; cet insecte exige par contre pour son développement : 1° un principe liposoluble insaponifiable, mêlé à de nombreux lipi-

des naturels, qui n'est pas le facteur A, et dont je n'ai pas précisé plus avant la nature, 2° des principes hydrosolubles présents dans la levure. Ces principes hydrosolubles sont probablement au moins deux. J'en ai précisé les propriétés physiques et chimiques. Si je n'ai pas réussi à les isoler, j'ai du moins purifié les fractions actives, pour les débarrasser de tout apport protéique indésirable.

II. Cette question préliminaire résolue, j'ai pu aborder l'étude du besoin qualitatif d'azote.

1° La *Drosophile*, comme les Mammifères, peut effectuer la synthèse de ses protides à partir d'azote aminé : les protides entièrement dégradés par l'hydrolyse acide sont efficaces, pourvu qu'on ajoute aux hydrolysats les acides aminés détruits par l'hydrolyse.

2° Les divers protides sont pour la *Drosophile* d'inégale qualité. On peut distinguer des protides complets (caséine, muscle, fibrine), des protides médiocres (séricine) présentant plusieurs facteurs limitants, et des protides déficients (gélatine, zéine). Ceux-ci, comme on l'observe chez les Mammifères, peuvent être supplémentés par des protides complets.

3° Les protides déficients peuvent être également supplémentés dans certains cas par des acides aminés purs ; et cette méthode peut être étendue à des protides artificiellement privés de certains acides aminés, comme on le fait pour les Vertébrés.

J'ai pu conclure ainsi à la nécessité certaine du tryptophane et de la cystine, à la nécessité probable de la lysine, de l'arginine et de l'histidine. Le besoin de tryptophane est immédiat, dès l'éclosion. Le besoin d'arginine et d'histidine se fait sentir plus tardivement au cours de la croissance larvaire. Enfin la privation de cystine manifeste surtout son effet au cours de la métamorphose. Ces différences ne sont sans doute qu'apparentes ; le minimum indispensable ne doit pas être le même pour tous les acides aminés et pour les diverses étapes de la croissance ; les carences que j'ai réalisées étaient sans doute inégalement sévères.

4° Les mélanges artificiels de tous les acides aminés connus, y compris la thréonine, sont inefficaces et ne peuvent être supplémentés par les composés extractifs qui accompagnent les peptones. Il leur manque un composé, présent dans

les protides complets et leurs hydrolysats acides, et qui ne se trouve pas non plus dans les protides du groupe des prolamines (gliadine, zéine). Il ressort de diverses expériences que ce composé doit être un acide aminé non-identifié, qui serait indispensable pour la *Drosophile*, mais non pour les Mammifères.

L'ensemble de ces recherches nous amène à conclure que les besoins azotés de la Drosophile sont comparables en complexité à ceux des Mammifères : ils semblent même plus stricts, car ils comportent un indéterminé supplémentaire.

Il est curieux de constater une telle similitude des besoins azotés, chez des animaux aussi éloignés du point de vue systématique que la *Drosophile* et les Mammifères. Une autre remarque peut être faite : on sait que d'autres Insectes, par exemple les Blattides, le Coléoptère de la farine, *Tribolium confusum*, paraissent au contraire assez peu exigeants en ce qui concerne les besoins azotés ; ces Insectes vivent d'ordinaire d'aliments (farines de céréales) assez pauvres en certains acides aminés. Il n'est pas interdit de penser que l'adaptation de telle ou telle espèce à tel ou tel régime puisse être en rapport avec les besoins azotés et le pouvoir de synthèse.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

Mécanisme hormonal de la Mue et de la Métamorphose des Insectes.

Vu et approuvé :

Paris, le 17 Janvier 1939.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN,

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

G. ROUSSY.

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER.

